

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Ekologická a evoluční biologie



**Michaela Zázvorková**

Ekologie a ekofyziologie psychrofilních řas

Ecology and ecophysiology of psychrophilic algae

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Linda Nedbalová, Ph.D.

Praha, 2016

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 18.8.2016

Podpis

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Lindě Nedbalové, Ph.D. za konstruktivní rady, trpělivost a milý přístup projevený během vedení mé bakalářské práce. A dále bych pak chtěla poděkovat Daně Krejčové, za zkorigování mých češtinářských excesů, a Danovi Kolaříkovi za nasměrování zpět na správnou cestu, pokaždé když jsem se ztratila v překladu.

## **Abstrakt**

Psychrofilní řasy jsou extremofilní fotoautotrofní organismy obývající nejrůznější chladné habitaty. Vyskytují se ve formě jezerního fytoplanktonu, porůstají mořské ledové kry a najdeme je také na povrchu ledovců a sněhové pokrývky. Ve svých habitatech často hrají důležitou ekologickou roli jakožto hlavní primární producenti. Tyto organismy žijí na hraně fyziologických možností a byly nuceny se přizpůsobit drsným podmínkám. Proto využívají mnoho adaptačních a aklimačních strategií, které jim pomáhají čelit chladu a extrémům v dostupnosti fotosynteticky aktivního a UV záření. Jednou z nich je desaturace mastných kyselin, která slouží k udržení fluidity membrán. Řada adaptací zatím není podrobněji prozkoumána. Zvláště enzymy a další proteiny psychrofilních řas jsou dosud téměř neprobádány. Nicméně psychrofilové jsou díky svému přizpůsobení na trvale chladné prostředí nesmírně zajímaví z hlediska mezních podmínek pro existenci života na Zemi, pro astrobiologii nebo kvůli potenciálnímu využití v biotechnologiích.

## **Klíčová slova:**

psychrofilní fotoautotrofové, chladné prostředí, fytoplankton, mořské ledové řasy, ledovcové řasy, sněžné řasy, pigmenty, enzymy, mastné kyseliny

## **Abstract**

Psychrophilic algae are extremophilic photoautotrophs that live in various cold habitats. They occur in the form of lake phytoplankton, overgrow sea ice floes and they can be also found on the surface of glaciers and snow. They often have an important ecological role as primary producers in their habitats. These organisms live on the edge of physiological possibilities and were forced to adapt to these harsh conditions. That is why they have evolved many adaption and acclimation strategies that help them to cope with cold and extremes in light and UV radiation availability. One of the well known strategies is the desaturation of fatty acids that is used for the maintenance of membrane fluidity. Most of these adaptaions haven't been researched in detail yet. Especially enzymes and other proteins of psychrophilic algae have been poorly explored. However, psychrophiles and their adaptaions to permanently cold environment are unbelievably interesting from the point of view the limits of life on Earth, for astrobiology and because of their potential use in biotechnologies.

## **Keywords:**

psychrophilic photoautotrophs, cold environments, phytoplankton, sea ice algae, ice algae, snow algae, pigments, enzymes, fatty acids

## Seznam zkratek:

- ATP – Adenosine triphosphate – Adenosintrifosfát
- DGDG – Digalactosyldiacylglycerol – Digalactosyldiacylglycerol
- DNA – Deoxyribonucleic acid – Deoxyribonukleová kyselina
- FAR – Photosynthetically active radiation – Fotosynteticky aktivní záření
- HPLC – High-performance liquid chromatography – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- IBP – Ice-binding proteins – Led-vázající proteiny
- LHCII – Light-harvesting complex II – Světlosběrný komplex II
- MGDG – Monogalactosyldiacylglycerol – Monogalactosyldiacylglycerol
- NPQ – Non-photochemical quenching – Nefotochemické zhášení
- PSI – Photosystem I – Fotosystém I
- PSI II – Photosystem II – Fotosystém II
- qP – Photochemical quenching – Fotochemické zhášení
- RNA – Ribonucleic acid – Ribonukleová kyselina
- ROS – Reactive oxygen species – Reaktivní formy kyslíku
- RuBisCo – Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase – Ribulóza-1,5-bisfosfát karboxyláza
- SOD – Superoxide dismutase – Superoxid dismutáza
- UV-A – Ultraviolet radiation A – Ultrafialové záření A
- UV-B – Ultraviolet radiation B – Ultrafialové záření B
- UV-C – Ultraviolet radiation C – Ultrafialové záření C
- VAZ – Violaxanthin, antheraxanthin and zeaxanthin – Violaxantin, antheraxantin a zeaxantin

## Obsah:

Abstrakt .....	IV
Abstract .....	IV
Keywords: .....	IV
Seznam zkratek: .....	V
Obsah:.....	VI
1 Úvod .....	1
2 Psychrofilní řasy .....	2
2.1 Planktonní psychrofilní řasy .....	3
2.1.1 Habitat .....	3
2.1.2 <i>Chlamydomonas raudensis</i> (UWO 241) .....	4
2.2 Mořské ledové řasy .....	7
2.2.1 Habitat .....	7
2.2.2 <i>Fragilariopsis cylindrus</i> .....	9
2.2.3 <i>Chlamydomonas</i> sp. ICE-L a <i>Chlamydomonas</i> sp. ICE-W .....	11
2.3 Ledovcové řasy .....	13
2.3.1 Habitat .....	13
2.3.2 <i>Ancylonema nordenskiöldii</i> .....	15
2.3.3 <i>Mesotaenium berggrenii</i> .....	17
2.4 Sněžné řasy .....	20
2.4.1 Habitat .....	20
2.4.2 <i>Chlamydomonas nivalis</i> .....	21
2.4.3 <i>Chloromonas nivalis</i> .....	25
3 Adaptační a aklimační strategie v trvale chladném prostředí.....	27
3.1 Membrány .....	27
3.2 Enzymy.....	29
3.3 Led-vázající proteiny a kryoprotektanty .....	30
3.4 Fotosyntéza.....	31
3.5 Stručný souhrn.....	32
4 Závěr.....	33
5 Literární zdroje .....	35

# 1 Úvod

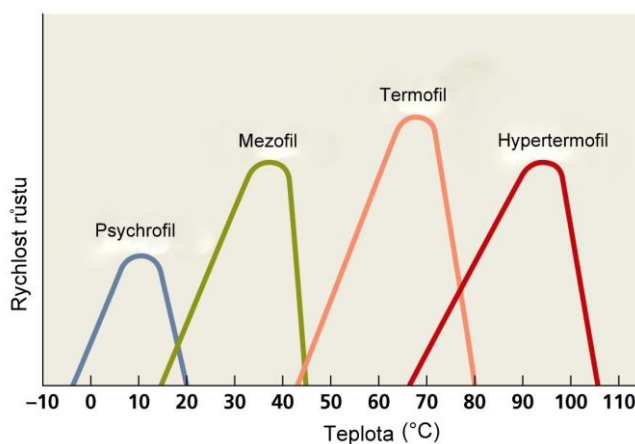
Trvale chladné habitaty, tedy ty, kde se průměrná teplota pohybuje stabilně kolem bodu mrazu, jsou rozšířenější, než by se nám mohlo zdát. Zabírají více jak 70 % Země, neboť k nim patří i hlubokomořské oblasti. Dále pak také polární a alpínské habitaty, které také tvoří významnou část zemského povrchu (Morgan-Kiss et al., 2006). Jenom mořský led v zimě pokrývá 13 % zemského povrchu a asi 75 % sladké vody je uloženo v antarktických ledovcích (Laybourn-Parry et al., 2012).

Tyto chladné habitaty obývají psychrofilní organismy, tedy v překladu „zimu milující“. Jako psychrofilní označujeme takový organismus, jehož teplotní optimum růstu je pod 10 °C či 15 °C (Obr. 1). Zdroje se v tomto ohledu poněkud různí. Každopádně by pro ně teplota 20 °C měla být letální (Morita, 1975). Psychrofilní organismy jsou obecně extremofilní specialisté žijící na hraně fyziologických možností, nicméně vyhledávající stabilní habitaty. Mezi psychrofilny můžeme zařadit především mnohé eubakterie, archaea, řasy i houbové organismy (Laybourn-Parry et al., 2012).

Všechny tyto organismy musely přizpůsobit své životní strategie chladnému prostředí, proto vyvinuly nejrozumnější

adaptace umožňující jim přežít nejen chlad, ale i další extrémní podmínky, provázející jejich domovské habitaty. S tím souvisí i produkce látek potenciálně zajímavých pro lidskou populaci.

Klíčovou skupinou v řadě extrémně chladných ekosystémů jsou fotoautotrofní mikroorganismy, které zajišťují primární produkci a umožňují tak rozvoj potravních sítí. V polárních i horských oblastech hrají tuto důležitou roli často sinice, jejichž teplotní optimum růstu je však většinou v oblasti vyšších teplot (> 15 °C) (Tang et al., 1997). Tato práce je věnovaná psychrofilním řasám, které se dají rozdělit podle pro ně typických habitatů. První skupina obývá pelagiál zamrzlých jezer, kde se potýká zejména s nedostatkem světla. Další skupinou jsou mořské ledové řasy, porůstající spodní strany ledových ker, případně



Obr. 1: Teplotní optima růstu jednotlivých skupin mikroorganismů (upraveno podle [www.academic.pgcc.edu](http://www.academic.pgcc.edu))

žijící ve volné vodě bezprostředně pod ledovou pokrývkou. I tyto druhy se musí vyrovnávat s nedostatkem světla, ale v jejich případě dochází během roku k fluktuacím v množství slunečního záření a i v míře salinity. Naopak skupina ledovcových a sněžných řas musí většinou řešit přesně opačný problém a to přílišnou intenzitu záření (Morgan-Kiss et al., 2006).

V této práci jsem se pokusila porovnat podmínky prostředí v různých typech trvale chladných habitatů, kde vyskytují psychrofilní fotoautotrofové. Dalším cílem práce bylo na základě několika jejich nejprostudovanějších zástupců demonstrovat způsob jejich života v trvale chladných prostředích a shrnout jejich adaptační a aklimační strategie nutné k přežití v těchto extrémních podmínkách.

## **2 Psychrofilní řasy**

Psychrofilní řasy je možné rozdělit do čtyř základních kategorií podle habitatu, který obývají:

- 1) Planktonní – obývající eufotickou zónu pelagiálu chladných jezer, a to buď trvale či periodicky zamrzlých
- 2) Mořské ledové řasy („sea ice algae“) – porůstající spodní část mořské ledové pokrývky
- 3) Ledovcové řasy („ice algae“) – obývající povrch ledovců
- 4) Sněžné řasy – rostoucí na povrchu sněhu

Tyto habitaty se mohou v mnoha parametrech lišit. Například v intenzitě UV a FAR záření nebo třeba salinitě či dostupnosti živin. Nicméně vždy jsou chladné a pokud možno stabilní (Morgan-Kiss et al., 2006). Zatím co planktonní a mořské ledové řasy se potýkají s tmou, ledovcové a sněžné naopak většinou trápí pravý opak. Tomu odpovídá i jejich způsob života.



## 2.1 Planktonní psychrofilní řasy

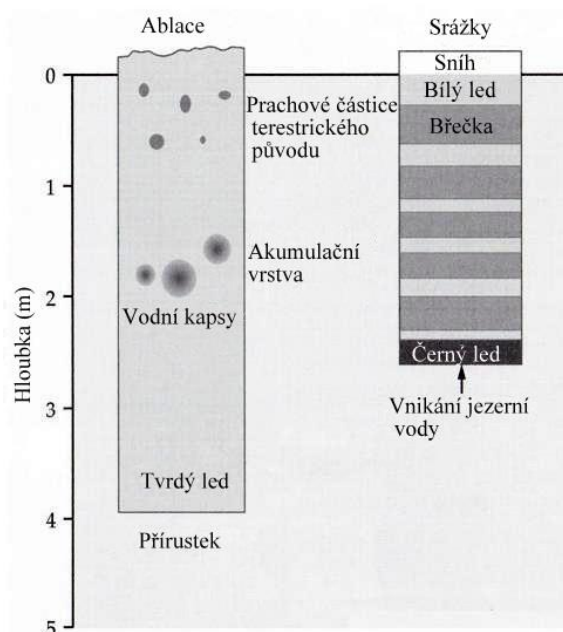
### 2.1.1 Habitat

Psychrofilní řasy mohou růst jak v periodicky zamrzajících, tak v trvale zamrzlých jezerech (Laybourn-Parry et al., 2012).

Trvale zamrzlá jezera se vyskytují například v Suchých údolích (McMurdo Dry Valleys), což je nejdrsnější a nejsušší poušť naší planety, která se nachází na jihu Viktoriiny země v Antarktidě. Nachází se zde jen skalnatá poušť, bez jakékoliv vegetace a sněhové pokrývky. Jsou zde téměř nulové srážky, silný vítr a průměrná roční teplota vzduchu se pohybuje kolem  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Priscu et al., 1999).

Všechna jezera v této oblasti jsou od okolní pustiny permanentně izolována vrstvou ledu, přičemž jejich ledová pokrývka má jinou strukturu než u vysokohorských jezer, nebo obecně jakýchkoliv jezer, kde dochází k akumulaci sněhu. Sezónní led je složen z vrstev, kdy nahoře je vrstva sněhu, pod ní vrstva „bílého“ ledu (white ice) a pod ní sněhová „břečka“ (slush), respektive směs malých ledových krystalků a kapalné vody. Tyto vrstvy se střídají a vespod bývá takzvaný „černý“ led (black ice), ke kterému odspoda může přimrzat vodní hladina. Led trvale zamrzlých antarktických jezer má jiný charakter a na rozdíl od sezónního ledu je hladký a transparentní, byť během léta degraduje a praská. Současně se v horních vrstvách často zachycují prachové částice (Obr. 2) (Laybourn-Parry et al., 2012).

Tloušťka ledu trvale zamrzlých jezer v Suchých údolích se pohybuje v rozmezí tří až šesti metrů a značně tak eliminuje jak míchání větrem, tak i množství slunečního záření, které projde až do vodního sloupce (Kong et al., 2014). Navíc během zimního období je zde po čtyři měsíce tma. V době polárního léta led odstíní 78–99 % dopadajícího FAR a absorbuje veškeré záření s vlnovou délkou nad 600 nm (Howard-Williams et al., 1998).



Obr. 2: Schématický profil jezerního ledu. Vlevo trvale zamrzlé jezero ze Suchých údolí z Antarktidy, napravo alpínské jezero, které v létě rozmrzá. (Upraveno podle Laybourn-Parry et al., 2012).

Nejprostudovanější z těchto jezer je jezero Bonney o rozloze 3,2 km<sup>2</sup> (Angino et al., 1964). Pokrývá ho led o tloušťce tří až pěti metrů a je asi sedm kilometrů dlouhé. V nejširším místě má jeden kilometr, přičemž je úžinou o šířce třiceti a hloubce dvanácti metrů rozděleno na dvě části – východní a západní. V obou částech dosahuje jezero hloubky kolem 40 m (Fritsen a Priscu, 1999) a průměrná hloubka se pohybuje kolem 18,7 m, bez ledové pokrývky (Angino et al., 1964). Západní část jezera přímo sousedí s Taylorovým ledovcem. Jezero je meromiktické (Angino et al., 1964) a kromě silné vertikální stratifikace je unikátní i díky svým fyzikálním, chemickým a biologickým vlastnostem (Fritsen a Priscu, 1999).

Pro organismy tak prostředí tohoto jezera vykazuje velké množství stresových faktorů a to od nízké teploty, vysoké salinity, nedostatku živin, přes stín a neobvyklé modro-zelené spektrum světla až po extrémní sezónní periodicitu (Dolhi et al., 2013). Například salinita u dna je pětikrát vyšší než salinita mořské vody a u hladiny je voda sladká (Spigel a Priscu 1998, podle Pocock et al., 2004). Nejnižší teplota, tedy -1,0 °C je u dna. Teplota na rozhraní vody a ledu má teplotu pouze 0 °C, zatímco v hloubce 14 m 6,1 °C (Priscu et al., 1999).

V jezeře Bonney žijí skryténky (Cryptophyceae), zlativky (Chrysophyceae), zelené řasy (Chlorophyta), sinice (Cyanobacteria, rod *Oscillatoria*), bakterie, viry, kvasinky, nálevníci, vířníci, houby (*Fungi*) a nejrůznější prvoci (Priscu et al., 1999). Celý tento planktonní ekosystém funguje na bázi mikrobiální smyčky, kdy organické látky uvolněné z metabolismu organismů, případně jejich mrtvá těla, využívají bakterie, které jsou následně požírány jednobuněčnými bičíkovci a prvoky, které následně konzumuje zooplankton.

### **2.1.2 *Chlamydomonas raudensis* (UWO 241)**

Z jezera Bonney byl vyizolován i endemická řasa UWO 241, která byla klasifikována jako kmen *Chlamydomonas raudensis* (Pocock et al., 2004), dříve mylně označována jako *Ch. subcaudata* (Neale a Priscu, 1995). *Ch. raudensis* je blízce příbuzná druhu *Ch. noctigama* (UTEX 2289) a foraminifernímu symbiontovi *Ch. hedleyi* (ATCC 50216). Mezi další příbuzné druhy patří chlad tolerující *Ch. bilatus* nebo *Chlamydomonas* sp., izolované z jezírka nad hranicí lesa ve Vysokých Tatrách a z rybníka v České republice. (Pocock et al., 2004).

Zajímavé je srovnání s kmenem *Ch. raudensis* SAG 49.72, který je na úrovni sekvence ITS1 a ITS2 rDNA (včetně 5,8S rDNA) totožný s UWO 241 (Pocock et al., 2004). Tento kmen byl vyizolovaný z českého lučního rybníka poblíž Rudné a jeho teplotní optimum je 29

°C – je tedy mezofilní – a poskytuje nám tak jedinečnou možnost srovnání a pochopení adaptací na trvale chladné prostředí (Dolhi et al., 2013).

UWO 241 je obligátně psychofilní kmen, který v teplotě nad 16 °C není schopen růstu. V přírodních podmínkách obvykle roste při teplotě 1–6 °C, byť jeho teplotní optimum je 10–16 °C (Morgan et al., 1998), teplota 24 °C už je pro něj letální. Při zahřátí na teplotu 24 °C na dobu 12 hodin došlo k indukci tvorby tzv. „heat shock“ proteinů, ale přes 90 % buněk přežilo (Possmayer et al., 2011).

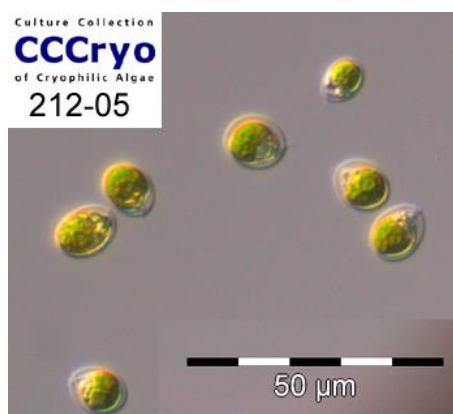
Morfologicky i fylogeneticky je kmen UWO 241 totožný s kmeny *Chlamydomonas* sp. CCMP 1619 (též pochází z jezera Bonney) a s již zmíněným kmenem *Ch. raudensis* SAG 49.72, od kterého se liší jen menšími buňkami a menším počtem velkých podjednotek RuBisCo, které vykazují o 30 % nižší aktivitu. *Ch. raudensis* SAG 49.72 také neobsahuje žádné „ice binding“ proteiny a snáší hůře vyšší salinitu. Kmen UWO 241 má během polárního léta v trvale zamrzlém jezeře Bonney důležitou ekologickou roli, jakožto primární producent. Je dominantní v hloubce 10–17 m pod ledem (Pocock et al., 2004) ve vodě o teplotě 4–6 °C (Morgan et al., 1998), kde je intenzita slunečního záření nižší než 15  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Lizotte a Prisco, 1994).

Kmen UWO 241 má dvoubíčíkaté buňky elipsovitého tvaru, dlouhá 10–15  $\mu\text{m}$  a široká 5–12  $\mu\text{m}$  (Obr. 3). Žije jak samostatně, tak i tvoří kolonie. Má šálkovitý parietální chloroplast s centrálně nebo bočně uloženým jádrem. UWO 241 ukládá škrob kolem pyrenoidu (Pocock et al., 2004), což je bezmembránová organela převážně obsahující enzym RuBisCo – důležitý

enzym pro temnostní fázi fotosyntézy a katalyzující některé reakce Calvinova cyklu.

Pohlavní rozmnožování u kmene UWO 241 zatím nebylo pozorováno a během asexuálního rozmnožování tvoří sprongia s pohyblivými buňkami. Sporangia obsahují 16–32 zoospor (Pocock et al., 2004).

Kmen UWO 241 má složení fotosyntetických pigmentů, které je typické pro chlamydomonády. Nejdůležitějším karotenoidem je lutein a po něm následuje  $\beta$ -karoten, neoxanthin, violaxanthin, antheraxanthin a zeaxanthin (Pocock et al., 2004). Poměr chlorofylu  $a/b$  je u této řasy nezvykle nízký ( $1,6 \pm 0,15$  mmol/mol chl  $a$ ) a to jak při srovnání s *Ch.*



Obr. 3: *Chlamydomonas raudensis* UWO 241 (zdroj: [www.cccryo.fraunhofer.de](http://www.cccryo.fraunhofer.de))

*reinhardtii* SAG 49.72, kde se hodnota pohybovala kolem 3,0, tak i s jinými druhy chlamydomonád z Hermitova ostrova, ležícího na severozápad od antarktického kontinentu, jejichž hodnota poměru chlorofylu *a/b* se pohybovala kolem 2,2 (Bidigare et al., 1993). Je možné, že díky těmto vlastnostem může růst UWO 241 při nízkém ozáření. Kromě toho má tato řasa i neobvyklý fotosyntetický aparát z hlediska složení i funkce. Má nízkou hladinu PSI a proteinů příbuzných PSII (Morgan et al., 1998).

Množství dopadajícího záření mohou chlamydomonády regulovat pomocí fototaxe. Schopnost aktivního pohybu je v prostředí trvale zamrzlých jezer klíčová pro udržení buněk v eufotické vrstvě, protože vrstva ledu zamezuje míchání vodního sloupce (Laybourn-Parry et al., 2012).

Stigma kmene UWO 241 je malé, eliptické a situované vpředu na chloroplastu. Kvůli jeho malé velikosti byl problém stigma v buňkách najít. Kmen UWO 241 je pozitivně fototaktický, ale je zvláštní, že jeho fototaxe roste spolu s teplotou. Je možné, že se jedná spíše o odpověď na teplo, než světlo. Zvyšující se fototaxí společně s rostoucí teplotou se UWO 241 liší například od *Ch. reinhardtii* (UTEX 89) (Pocock et al., 2004).

UWO 241 vykazuje velkou fyziologickou plasticitu a buňku více ovlivňuje vyšší teplota, než větší ozáření. Teplota se jevila jako zásadnější parametr i s ohledem na fototaxi a letalitu. Zvýšená teplota UWO 241 připraví o možnost fotosyntetizovat, neboť pak dochází k problému s transportem elektronů (Possmayer et al., 2011).

Co se světla týká, tak UWO 241 je zajímavá i tím, že postrádá schopnost redistribuovat světelnou energii při krátkodobých změnách stavu. Nicméně podobně jako modelová mezofilní řasa *Ch. reinhardtii* i UWO 241 zachovává kapacitu pro dlouhodobou úpravu v distribuci energie mezi PSI a PSII modulující hodnotou reakčního centra polypeptidu PSI PsaA/PsaB, zároveň s minimální změnou polypeptidu PSII, D1, v odpovědi na změnu kvality světla. UWO 241 neumí pro fotosyntézu využít červené světlo, což za pro ni běžných podmínek nevadí, protože žije v prostředí, kam proniká jen modro-zelené záření, které umí využít srovnatelně efektivně jako ostatní řasy. Když ji v laboratorních podmínkách vystavili červenému světlu, přestala růst a došlo ke snížení výkonu fotosyntézy, dále pak vzrostl redukční stav intersystému zásoby plastochinonu, doprovázeného vzrůstem nefotochemického zhášení. Také došlo k rozpráhnutí hlavního světlosběrného komplexu z aktivního centra PSII (Morgan-Kiss et al., 2005).

Funkční důsledky modulace v PSI / PSII stechiometrii jsou u tohoto psychrofila odlišné od těch, které byly pozorovány u mezofilní řasy *Ch. reinhardtii*. Podmínky v jezeru Bonney

jsou sice extrémní, ale teplota a kvalita světla jsou stabilní a kmen UWO 241 je jim přizpůsoben (Morgan-Kiss et al., 2005).

Další adaptací na specifické prostředí trvale zamrzlého jezera – konkrétně na nízké teploty – je nárůst poměru nenasycených a nasycených mastných kyselin v membránových lipidech. Zároveň jsou membránové lipidy tvořeny unikátními kombinacemi mastných kyselin, které mohou za zvýšenou tepelnou citlivost membrán thylakoidů. Obojí je důležité pro integritu membrán při nízkých teplotách a také to pomáhá udržet specifickou prostorovou vazbu mezi světlosběrným komplexem PSII (LHCII) a PSII v membráně thylakoidu, potřebnou pro přenesení energie absorbovaného fotonu do PSII. Se zvýšenou fluiditou lipidů při nízkých teplotách korelují i nižší prahové teploty pro tepelnou stabilitu membrán thylakoidů (Morgan-Kiss et al., 2002). Membrány jsou obecně málo saturovány lipidy a také dochází ke změnám na úrovni primární struktury enzymů (Possmayer et al., 2011).

## **2.2 Mořské ledové řasy**

### **2.2.1 Habitat**

Mořský led pokrývá rozsáhlé oblasti na severní i jižní polokouli. Jeho rozloha se mění, ale v zimě může mořský led zabírat až 13 % zemského povrchu, takže představuje jeden z důležitých ekosystémů planety. Největší plochu zabírá v Jižním oceánu kolem antarktického kontinentu. Antarktický ekosystém je dynamický, vysoce variabilní a podléhá sezónním změnám. Na jaře dochází k odtávání ledu a následné stratifikaci vodních vrstev s různou salinitou (Laybourn-Parry et al., 2012).

Další skupinou jsou psychrofilní mikrořasy, tedy mořští fotoautotrofové, obývající prostředí ledové pokrývky a z valné většiny porůstající její spodní vrstvu, případně obývající pelagiál bezprostředně pod ní. Největší primární produkce psychrofilních řas v tomto habitatu byla naměřena právě ve vrstvě několika posledních centimetrů na spodní straně ledu. Je možné, že za tento jev může vysoká dostupnost živin a současně nízká salinita. (Mock a Gradinger, 1999). Organismy žijící v ledu a blízkém okolí ovlivňují extrémní sezónní změny, kdy na jaře nastává období tání a uvolňování buněk z ledu do pelagiálu. Tím jsou organismy vystaveny změně salinity i množství dopadajícího světla. Množství světla během roku ovlivňuje i počasí a to zejména sněhové srážky (Petrou et al., 2011). Autotrofové žijící tímto způsobem se tedy musí vyrovnat s nedostatkem světla. Led se ve srovnání s vodou vyznačuje

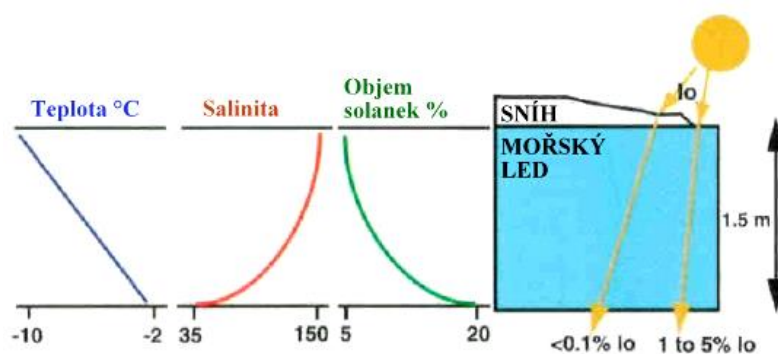
vyšší absorpci světla, a tak jím často projde jen 1 % z celkového množství dopadajícího záření. V případě sněhové pokrývky na povrchu ledu to může být ještě o něco méně (Obr. 4) (Laybourn-Parry et al., 2012), takže míra ozáření může být nižší než  $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Mock a Junge, 2007).

Dalším problémem, se kterým se autotrofové v mořském ledu potýkají, jsou

trvale velmi nízké teploty, které mohou dosáhnout až hodnoty  $-20^\circ\text{C}$ . Organismy tedy musely zvládnout se s těmito podmínkami vyrovnat, o čemž svědčí i velký podíl psychrofilů obývajících tento habitat (Thomas a Dieckmann, 2002, Laybourn-Parry et al., 2012).

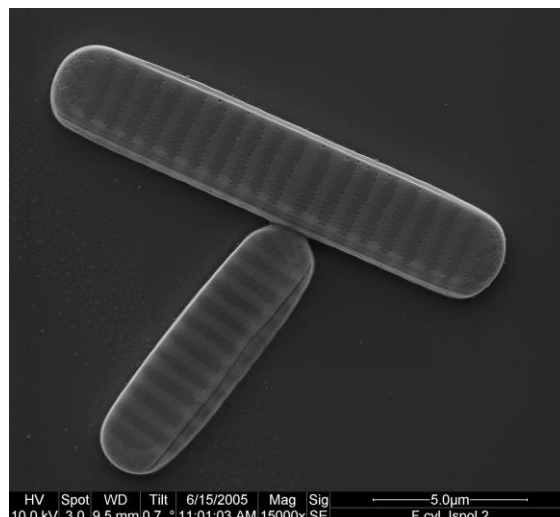
Neposledním problémem je měnící se salinita. Zmrzlá mořská voda vyloučí až 70 % solí, které pak zůstanou v hustých slaných roztocích v tekutých kapsách – takzvaných solankách. Nicméně při oblevě a následném tání se tyto roztoky mohou výrazně naředit. Schopnost odolávat osmotickému stresu je tedy nezbytnou adaptací (Laybourn-Parry et al., 2012), neboť salinita se může pohybovat v hodnotách 35–200 ppt a pH stoupnout až nad 11 (Mock a Junge 2007, podle Liu a Huang, 2015).

Mořský led není jednolitá kompaktní hmota, ale obsahuje řadu kanálků a pórů, přičemž právě velikost solankových kanálků do značné míry ovlivňuje kolonizaci. Více jak polovina jich má průměr menší než  $200 \mu\text{m}$ . Kanálky těchto rozměrů obývají řasy, protozoa a bakterie. Mimo to v mořském ledu se vyskytují i viry. Tato společenstva pak slouží jako potrava klanonožcům a krilu, obývajícím větší solanky, a ti následně fungují jako jeden z hlavních zdrojů potravy pro vyšší trofické hladiny. Okraje ledu vykazují vyšší biologickou aktivitu, a tak se kolem něj i shromažďují velryby živící se krilem, přičemž kril se živí právě řasami (Laybourn-Parry et al., 2012). Významné je zejména, že organismy uvolňující se z mořského ledu slouží jako zdroj potravy v době mimo maximum primární produkce ve volné vodě (Thomas a Dieckmann, 2002)



*Obr. 4: Gradient teploty, salinity i objem solanek jsou po celé ploše mořského ledu ve vertikálním profilu pevně stanoveny. Spodní strana má vždy teplotu bodu tuhnutí mořské vody, tedy  $-1,8^\circ\text{C}$  a horní část ledu se blíží teplotě vzduchu. Nicméně do značné míry mohou být gradienty ovlivněny sněhovou pokrývkou, která může výrazně snížit množství dopadajícího světla. (Upraveno podle Thomas a Dieckmann, 2002).*

Nejdůležitější skupinou řas žijící v mořském ledu jsou penátní rozsivky, přičemž nejhojnější je druh *Fragilariopsis cylindrus* (Obr. 5) (Laybourn-Parry et al., 2012). Dalšími rozsivkami žijícími v mořském ledu jsou například *Fragilariopsis curta*, *Synedropsis* sp. nebo *Stauroneis amphyioxys* (Aslam et al., 2012). Dále zde byli nalezeni i autotrofové z tříd Chrysophyceae, Chlorophyceae, Cryptophyceae, Dinophyceae, Prymnesiophyceae a Prasinophyceae (Morgan-Kiss et al., 2006).



Obr. 5: *Fragilariopsis cylindrus* (zdroj: [www.awi.de](http://www.awi.de))

### 2.2.2 *Fragilariopsis cylindrus*

Právě díky dominanci rozsivek je spodní strana mořského ledu často hnědě zbarvena (Obr. 6). Obsahují totiž velké množství hnědého fotosyntetického pigmentu fukoxantinu, který překrývá zelenou barvu chlorofylu *a*, který obsahují veškeré řasy (Laybourn-Parry et al., 2012). Rozsivky obecně dobře snášejí výkyvy intenzity záření a fukoxantin efektivně zachytává právě ty vlnové délky, které nejlépe procházejí ledem (Thomas a Dieckmann, 2002). Stejně jako u ostatních psychrofilů, i mořské rozsivky bojují proti nízkým teplotám desaturací mastných kyselin v membránách (Laybourn-Parry et al., 2012). Typické nenasycené mastné kyseliny pro ně jsou 16:1(n-7) a 20:5 (n-3) (Fahl a Kattner, 1993). Při nižších teplotách se



Obr. 6: Hnědě zbarvená spodní strana ker. (zdroj: [www.antartica.gov.au](http://www.antartica.gov.au))

u nich zvýší poměr nenasycených a polynenasycených mastných kyselin s krátkými řetězci. Díky tomu je membrána fluidní i za nízkých teplot (Laybourn-Parry et al., 2012).

*F. cylindrus* má osekvenovaný genom (Mock et al., 2006) a při dalším zkoumání se ukázalo, že má jen 62 % homologních sekvencí s mezofilními rozsivkami. V genomu tohoto druhu se podařilo



identifikovat sekvence kódující iontové transporty, geny pro „heat shock“ proteiny, geny související s oxidativním stresem a tři klíčové geny zapojené do syntézy prolinu, nejdůležitějšího organického osmolytu u *F. cylindrus*. Navíc byla popsána nová třída „ice-binding“ proteinů (Krell et al., 2008).

Konkrétně druh *F. cylindrus* vykazuje vysokou fotosyntetickou plasticitu a velkou míru aklimace na prostředí. Je schopný žít i volně, ale primárně je adaptovaný na život v mořském ledu. Také je schopný účinně regulovat rozdělení světelné energie pomocí xantofylového cyklu a nefotochemického zhášení (dále jen NPQ) (Petrou et al., 2011).

NPQ je mechanismus obecně využívaný rostlinami a řasami na ochranu při přílišném ozáření. Dochází přitom k zhášení excitovaného chlorofylu a přebytečná energie je neškodně odvedená ve formě tepla prostřednictvím molekulárních vibrací. Tento mechanismus je důležitý, když je autotrof vystaven vyššímu ozáření, než je třeba pro fotosyntézu (Muller et al., 2001).

*F. cylindrus* má vysokou kapacitu NPQ, která vede k vyššímu vybuzení fotochemického zhášení (dále jen qP). To je už samo o sobě konzistentně nižší než u druhů, se kterými byla srovnána (*Pseudo-nitzschia subcurvata*, *Chaetoceros* sp.). Nicméně v podmínkách mořského ledu hodnota qP o 30 % vzrostla.

K tomu obsahuje diatoxanthin, což je fotoprotektivní violaxantin de-epoxidáza (Petrou et al., 2011) chránící membránu před poškozením. Xantofylový cyklus chrání fotosyntetický aparát před fotooxidativním poškozením způsobeným nadměrnou ozářeností (Pandey et al., 2005).

Vliv poklesu teploty z 5 °C na -1,8 °C na fotosyntézu a expresi genů druhu *F. cylindrus* studovali Mock a Valentin (2004). Při vyšší ozářenosti (35  $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) došlo k poklesu fotosyntetického kvantového výtěžku ( $F_v/F_m$ ). Naproti tomu při nízké ozářenosti (3  $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) došlo k nepatrnému růstu  $F_v/F_m$  a k výraznému zvýšení koncentrace fukoxantinu. Při obou ozářenostech vzrostl poměr chlorofylu *c* a chlorofylu *a* stejně jako se zvýšil poměr diatoxantinu a diadinoxantinu. Protože exprese některých genů (*geHsp70*, *EfTs*, *rpS4*, a *ftsH* proteáza) se zvýšila pouze ve vyšší intenzitě záření je pravděpodobné, že jsou nezbytné pro zabránění fotoinhibici při chladovém šoku (Mock a Valentin, 2004).

Když se *F. cylindrus* dostane při odtávání z mořského ledu do pelagiálu, klesne poměrné množství chlorofylu *c* a také vzroste množství fotoprotektivních pigmentů. Současně se u *F. cylindrus* nacházelo i nejvíce světlosběrných pigmentů, což ukazuje na to, že je přizpůsobená větší absorpci světla pod ledem, tedy že maximalizuje svůj výkon ve stínu. Naopak nejvyšší



absorbce chlorofylu *a* byla naměřena u vzorku žijícím v mořském ledu. Navíc teplotně závislá odpověď  $\sigma_{PSII}$  indikuje vysokou fyziologickou plasticitu fotosyntetického aparátu a schopnost se adaptovat na rozdílné environmentální i světelné podmínky. K tomu má *F. cylindrus* velkou kapacitu pro rychlé změny v množství dopadajícího světla. (Petrou et al., 2011).

S rostoucí teplotou se efektivní absorpční plocha  $\sigma_{PSII}$  na průřezu zmenšuje. Buňky při oteplení zmenšují průřezovou plochu  $\sigma_{PSII}$ , a tím jsou schopny kompenzovat změny v míře expozice fotonům. Ta se při oteplení díky tání zvyšuje (Petrou et al., 2011). Fyziologická aklimace na změnu intenzity záření a spektra je doprovázena morfologickými změnami jako je změna objemu buňky, počtem a hustotou thylakoidních membrán, velikostí pyrenoidu nebo například změnami plastidů v buňce. Buňky aklimatizované na stín obvykle tvoří více thylakoidů. Na buněčné úrovni dochází i ke změnám pigmentů, složení a obsahu lipidů. Průřezová plocha PSII je vlastně měřítkem funkční složky anténích pigmentů, které dodávají a absorbují světelnou energii na fotosystému (Falkowski a Laroche, 1991).

Vzhledem k tomu, že u *F. cylindrus* nenastaly při vyšší ozáření žádné změny v obsahu chlorofylu *a*, tak za změnu velikosti antén jsou nejspíše zodpovědné změny v pigmentech, nebo velikost buněk, které se po opuštění ledu mohly zvětšit. Při změně poměru fotoprotektantních pigmentů si však *F. cylindrus* stále udržuje nízký poměr de-epoxidace a na diatoxanthin se změní jen malé množství diadinoxanthinu. K této přeměně dochází souběžně s tím, jak narůstá záření. Také v případě antarktických rozsivek aktivace NPQ vyžaduje, aby reakční centra PSII byla blízko u sebe. K čemuž dochází opětovně výrazněji při životě v ledu (Petrou et al., 2011).

Možnosti fotosyntetizovat ovlivňují nejen pigmenty a dostupnost světla, ale i salinita vody. S rostoucí salinitou roste i stres, kterému jsou řasy vystaveny a zapříčiňuje tak pokles fotosyntézy. Ke změně účinnosti dochází zvláště u PSII (Ralph et al., 2007).

Ve výsledku je pro fototrofní organismy žijící na spodní straně mořské ledové pokrývky nezbytně nutné mít účinný fotosyntetický aparát, schopný pracovat při nízkém ozáření, zvládat osmotický stres (Petrou et al., 2011) a nízké teploty, protože enzym RuBisCo má při nízkých teplotách nízkou katalytickou hodnotu.

### **2.2.3 *Chlamydomonas* sp. ICE-L a *Chlamydomonas* sp. ICE-W**

Dalšími autotrofy izolovanými z mořského ledu, kterým byla věnována řada studií, jsou dva kmeny chlamydomonád – *Chlamydomonas* sp. ICE-L a *Chlamydomonas* sp. ICE-W. Molekulární i morfologické znaky ukazují, že se jedná o stejný druh. Jedná se

o jednobuněčné, pohyblivé buňky s tenkou buněčnou stěnou a papilou. Jsou oválné a mají chloroplast s velkým pyrenoidem a dva bičíky. Uprostřed buňky mají též oranžovou světločivnou skvrnu. Množí se dělením a pohlavní rozmnožování u nich nebylo pozorováno. Navzájem se od sebe liší jen šesti rozdílnými bázemi v 18S rDNA a devíti bázemi v sekvenci ITS. Navíc jsou velice příbuzné na základě molekulárních i morfologických znaků druhu *Chlamydomonas monadina* (Liu et al., 2006), sladkovodní řase nalezené i v České republice ([www.portal.nature.cz](http://www.portal.nature.cz) a [www.algaebase.org](http://www.algaebase.org)).

*Chlamydomonas* sp. ICE-L i *Chlamydomonas* sp. ICE-W byly izolovány z plovoucího antarktického ledu, kde jsou schopné se úspěšně množit a šířit. Jsou psychrofilní a nepřežijí teplotu nad 15 °C, přičemž jejich teplotní optimum se pohybuje v rozmezí od 0 °C do 10 °C (Liu et al., 2006). Obě dvě jsou při srovnání s mezofilními řasami odolnější proti UV-B záření (Miao et al. 2002, podle Liu et al., 2006).

Sekvence *rbcL* kódující velkou podjednotku enzymu RuBisCo je u těchto dvou kmenů bez intronů. V rámci zkoumání příčiny zvýšené termosenzitivity enzymu RuBisCo byly sekvence srovnány ještě s dalšími dvěma psychrofilny a několika mezofily. Našla se však jen jedna aminokyselina, jejíž pozice by byla shodná pro všechny psychrofilny a současně jiná pro mezofily. Zdá se tedy, že při adaptaci na chlad není ani tak zásadní substituce aminokyselin, jako míra *rbcL* RNA exprese (Liu et al., 2006).

V kmenu *Chlamydomonas* sp. ICE-L bylo celkem identifikováno 39 genů DEAD-box RNA helikázy (Liu a Huang, 2015), což je helikáza, která napomáhá rozvolnit nukleové kyseliny, které se běžných podmínek rozvolňují hlavně pomocí tepla (Iost et al., 2013). Tato helikáza byla až na pár výjimek shodná s helikázou mezofilní řasy *C. reinhardtii*. Homologní protein v *Chlamydomonas* sp. ICE-L, důležitý pro toleranci chladu, byl nalezen při srovnávací studii i v *Arabidopsis thaliana*, nicméně při vystavení stejné nízké teplotě není odpověď genů této helikázy vždy identická. Exprese několika DEAD-box RNA helikáza genů při vystavení nižší teplotě vzrostla. To se týkalo konkrétně genů CiRH5, CiRH25, CiRH28 a CiRH55 (Liu a Huang, 2015).

Buňky *Chlamydomonas* sp. ICE-L byly podrobeny experimentu s využitím kvantitativní polymerázové řetězové reakce (jinak též Real-time PCR).

Při ochlazení na -20 °C se v buňkách víc jak dvakrát zvýšila exprese genů DEAD-box RNA helikáza genů. Rozdílná rychlost transkripce jednotlivých genů signalizuje různé role v adaptaci na chlad (Liu a Huang, 2015).

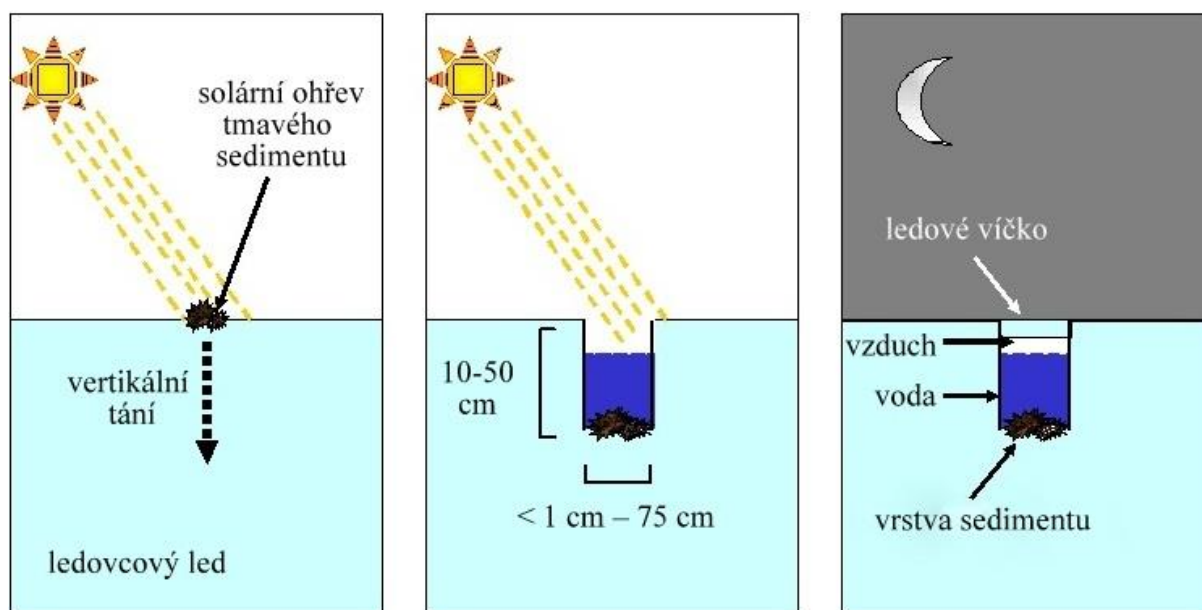
Nejvýraznější změnu v expresi při vystavení chladnému prostředí vykazoval gen CiRH28. Proto bylo provedeno srovnání jeho proteinovou sekvence s homologními geny druhů *C. reinhardtii* (shoda s CiRH28 53,2 %), z *Volvox carteri* (53,5 %) a AtRH28 z *A. thaliana* (42,4 %). Ze studie vyplynulo, že frekvence polárních aminokyselin je 20,85 % (což je vyšší hodnota, než naměřená u *C. reinhardtii* – 17,12 %) a četnost hydrofóbních aminokyselin je 29,5 % (u *C. reinhardtii* byla 32,4 %). Při srovnání *Chlamydomonas* sp. ICE-L s mnohobuněčným *V. carteri* se ukázalo, že ICE-L obsahuje více DEAD-box RNA helikázy, což značí, že ICE-L je v odpovědi na abiotický stres na buněčné úrovni flexibilnější (Liu a Huang, 2015).

U *Chlamydomonas* sp. ICE-L byla též studována odolnost vůči UV-B záření, se zaměřením na růst a antioxidační enzymy. Tomuto záření je vystavena zejména na jaře, kdy dochází k odtávání z ledu do pelagiálu a i k růstu ozáření. *Chlamydomonas* sp. ICE-L je autotrofní řasa a světlo k životu potřebuje, proto se ani UV-B záření nevyhne. Nicméně UV-B způsobuje oxidativní stres, inhibuje růst – zvláště při vysoké míře ozáření ( $70 \mu\text{W cm}^{-2}$ ), jeho působení vzrůstá množství superoxidů a malondialdehydů a více se akumulují peroxidy lipidů. Současně se vzrůstající intenzitou UV-B záření dochází i ke zvýšení aktivity superoxid dismutázy (dále jen SOD), peroxidázy a katalázy. Systém antioxidačních enzymů hraje u antarktických řas důležitou roli v přizpůsobení se na změnu intenzity UV-B záření (Wang et al., 2009). Nejdůležitějším z těchto enzymů je nespíše SOD, který má klíčovou roli u jednobuněčných řas v antioxidačním systému (Janknekt et al., 2008). SOD katalyzuje přechod superoxidů na  $\text{O}_2$  a peroxidy, což je často první linie obrany vůči reaktivním formám kyslíku (dále jen ROS) (Wang et al., 2009). ROS – nebo také tzv. kyslíkové radikály – jsou extrémně reaktivní a narušují běžný buněčný metabolismus a vyvolávají oxidační stres, tudíž je pro buňku nezbytné se proti jejich působení bránit (Dawes, 2000).

## **2.3 Ledovcové řasy**

### **2.3.1 Habitat**

Další ne příliš prozkoumaná skupina jsou řasy žijící na povrchu ledovců – nejčastěji v tzv. kryokonitových jamkách, které mohou představovat jedinečné ekosystémy (Morgan-Kiss et al., 2006). Kryokonitové jamky dominují zejména v centrální části ledovce. Vznikají tak, že se naváté tmavé částice prachu či mikroorganismů usadí v prohlubni a stmelí se



Obr. 7: Schéma vzniku kryokonitu. (upraveno podle: [www.snowaddiction.org](http://www.snowaddiction.org))

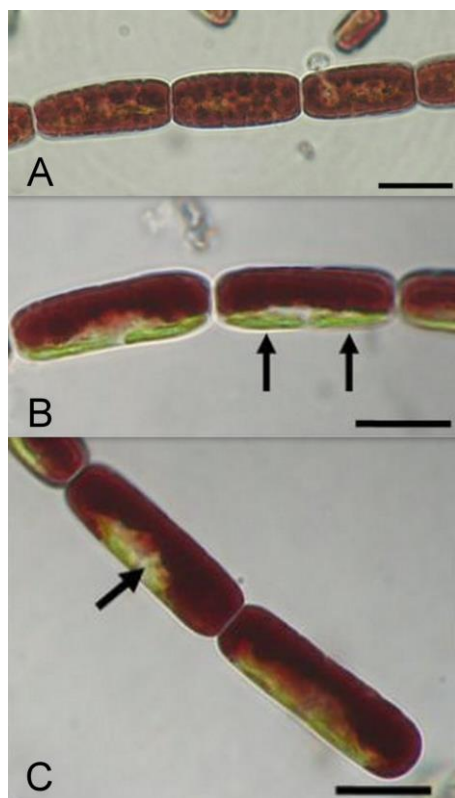
dohromady (Laybourn-Parry et al., 2012). Na slunci se tmavé částice zahřívají, taví led v blízkém okolí a vznikají tak válcovité otvory s kapalnou vodou i v podmínkách, kdy se teplota vzduchu pohybuje pod bodem mrazu (Morgan-Kiss et al., 2006). Rozměr jamek se pohybuje řádově v centimetrech do šířky i do hloubky ale můžeme najít i výrazně větší (Obr. 7). V těchto jamkách dochází k interakci mezi buňkami a minerály a tím tak k tvorbě biofilmů. Po vytvoření biofilmu kryokonit průběžně narůstá dál, dokud je dostupné dostatečné množství dalšího sedimentu a mikroorganismů (Laybourn-Parry et al., 2012). Mikroorganismy mohou dokonce slepovat zrna minerálů a tvořit tak v jamkách vnitřní struktury (Hodson et al., 2010).

V kryokonitu žijí bakterie, sinice, fototrofní i heterotrofní nanoflageláti, rozsivky nálevníci i mnohobuněčné organismy. Ze sinic byly například nalezeny rody jako *Chlorococcus*, *Chroococcus*, *Crinalium*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Leptolyngbya*, *Nostoc* a *Spirulina*, z vířníků druhy *Philodina gregaria* a *Cephalodella catalina*, dále pak želvušky jako *Acutuncus antarcticus*, *Hypsibius* spp. Byla nalezeny i hlístice, ne však v kryokonitu v Antarktidě (Porazinska et al., 2004). Fototrofní druhy obývající kryokonit bývají halofilní, aerofytické, epipelické či bryofilní (Laybourn-Parry et al., 2012). Tito autotrofové, nalezeni jak v Arktidě, tak Antarktidě i alpských ledovcích, slouží jako potrava metazoi žijící spolu s nimi v kryokonitu. Během polárního léta je v kryokonitových jamkách tekutá voda, nicméně během zimy zamrzají a v nich žijící společenstva mohou přežít v dormantním stádiu (Morgan-Kiss et al., 2006).

Jedním z autotrofů žijícím na povrchu ledovců je například *Ancylonema nordenskiöldii*, *Cylindrocystis* sp. (Morgan-Kiss et al., 2006) nebo *Mesotaenium berggrenii* (Remias et al., 2009).

### 2.3.2 *Ancylonema nordenskiöldii*

*A. nordenskiöldii* je řasa z řádu Zygnematales, blízce příbuzná druhu *Mesotaenium berggrenii*. Je to extremofilní sladkovodní řasa žijící výhradně na povrchu ledovců. Žije v drsných podmínkách, kde je vystavena nízkým teplotám a vysoké intenzitě záření. Vegetační sezóna je velmi krátká. Byla pozorovaná na mnoha lokalitách v polárních i v horských oblastech. Detailní popis ekofyziologie a ultrastruktury byl proveden ze vzorků sebraných na Svalbardu. *A. nordenskiöldii* byla nalezena v kryokonitu mezi tmavým zrnitým

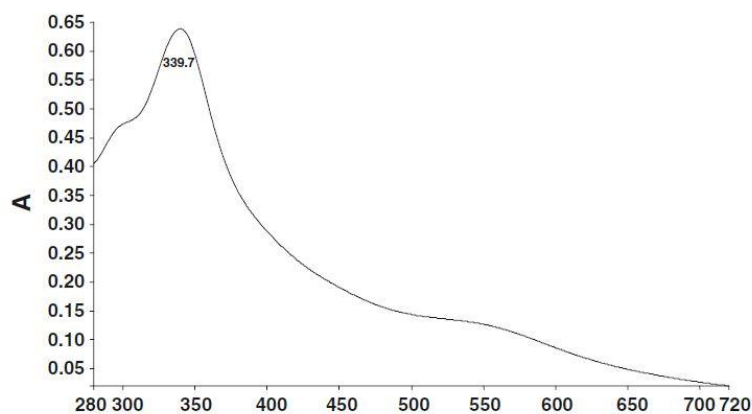


Obr. 8: *Ancylonema nordenskiöldii*. A) svrchní pohled na tmavé vakuoly B) pohled z boku – dva parietální chloroplasty C) centrální průsvitná část s jádrem (upraveno podle Remias et al., 2012a)

materiálem. Nejhojněji se vyskytovala ve firnu uprostřed ledovce na hraně akumulární a ablační zóny, zvláště tam, kde se nacházela i tekutá voda. *A. nordenskiöldii* obývala horní 2–3 cm ledu. Teplota se zde během letního dne pohybovala v noci kolem 0 °C a během dne rostla zhruba o dva stupně. Hodnota pH tajícího ledu byla neutrální, konduktivita 3 až 20  $\mu\text{S cm}^{-1}$ . Hodnota FAR se pohybovala kolem 1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , intenzita záření UV-A byla relativně nízká (20,8–23,1  $\text{W m}^{-2}$ ), UV-B ještě nižší (49,0–63,3  $\text{mW m}^{-2}$ ). (Remias et al., 2012a).

*A. nordenskiöldii* má cylindrické zeleno-hnědé buňky tvořící nerozvětvená vlákna. Jedno řasové vlákno obsahuje 2–64 buněk. Buněčná stěna *A. nordenskiöldii* je extrémně hladká, tenká a neobsahuje žádné póry ani plasmodesmy. Každá buňka obsahuje jádro, mitochondrie, golgiho aparát, endoplazmatické retikulum, dva parietální chloroplasty a pyrenoid se škrobovými zrny (Obr. 8, Remias et al., 2012a).

Nejvýznačnější strukturou v buňkách byly osmofilní periferní nahnědlé vakuoly se sekundárními



Obr. 9: Spektrofotometrická absorbance vodného roztoku z buněk *Ancylonema nordenskiöldii* (Remias et al., 2012a).

pigmenty. Během intenzivního růstu do nich buňky *A. nordenskiöldii* ukládají velké množství pigmentů a způsobují tak hnědé zbarvení ledovců. Hnědý vakuolární pigment nejlépe absorboval záření o vlnové délce kolem 340 nm – tzn. dobře absorbuje UV-A a UV-B záření. Absorbance FAR je nižší, nicméně pigmenty

absorbují v celém spektru 400–700 nm a to způsobuje právě hnědou barvu (Obr. 9) (Remias et al., 2012a). S ohledem na podobnost *A. nordenskiöldii* s *M. berggrenii* se jedná s největší pravděpodobností o velké množství fenolových látek, zřejmě odvozených od purpurogallinových derivátů fenolů (Remias et al., 2012b). Velký počet nahnědlých vakuol s těmito sekundárními pigmenty schopnými úspěšně pohlcovat UV záření chrání buněčné organely, zejména jádro a chloroplast, před UV a ROS (Remias et al., 2012a).

Při měření výkonu fotosyntézy za různých teplot se ukázalo, že metabolismus *A. nordenskiöldii* je přizpůsoben nízkým teplotám a vysoké ozáření.

Při teplotě 1°C a nízké ozáření, tedy  $< 400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  byla produkce kyslíku nejefektivnější, zatímco při teplotě 10 °C a 20 °C a ozáření  $> 400 \mu\text{mol FAR}$  byla fotosyntetická rychlost vyšší. Nicméně spotřeba kyslíku se při vyšších teplotách výrazně zvýšila, stejně jako potřebné množství světla, a tak došlo k výraznému zvýšení hodnoty kompenzačního bodu fotosyntézy – zhruba na  $100 \mu\text{mol FAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$  při 10 °C. Nicméně k snížení účinnosti fotosyntézy nedošlo ani při ozáření vyšších než  $1900 \mu\text{mol FAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Dobrou úroveň fotosyntézy při ozáření  $> 400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  lze vysvětlit buďto přítomností adaptací na vysokou míru záření anebo ochranou chloroplastů před fotoinhibicí pomocí sekundární pigmentace. *A. nordenskiöldii* je metabolicky i cytologicky výborně přizpůsobena životu na ledovci. Při stresu způsobeném vyšší teplotou dochází ke značné spotřebě energie a měření naznačují, že se jedná o psychrofilní organismus, který si udržuje i v extrémních podmínkách na povrchu ledovců vysokou rychlost metabolismu (Remias et al., 2012a).

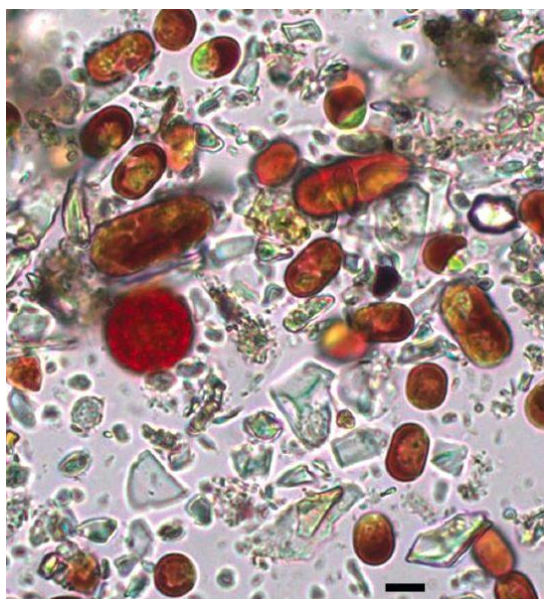
### 2.3.3 *Mesotaenium berggrenii*

Dalším autotrofem přizpůsobeným k životu na holém povrchu ledovců je již výše zmíněná jednobuněčná zelená řasa *M. berggrenii*, která stejně jako *A. nordenskiöldii* patří do třídy Zygnematophyceae. *M. berggrenii* je také považována za kosmopolitní druh obývající alpské i polární oblasti, nicméně zprávy o jejím výskytu jsou poměrně řídké (Remias et al., 2009). Je možné, že za to může její relativní nenápadnost, neboť například vzorek sebraný na Windmillových ostrovech, patřících k Antarktidě, byl původně popsán jako řasa šedého sněhu (Ling a Seppelt, 1990). Nicméně v pozdější studii, prováděné ve výšce 3 000 m n. m. na Tiefenbachském ledovci v Tyrolských Alpách v Rakousku, Remias et al. (2012b) zaznamenali, že husté populace této řasy způsobují spíše slabě tmavofialové zabarvení ledového povrchu, a to zejména při přímém slunečním světle. Navíc se *M. berggrenii* vyskytovala jen na holém ledu. Na sněhu ani na jiném než ledovém substrátu nebyl výskyt tohoto druhu zaznamenán. Sice roste i v kryokonitových jamkách, nicméně se vyskytuje především na povrchu ledové pokrývky. Je to poněkud překvapivé, neboť existují i práce popisující *M. berggrenii* jako sněžnou řasu (Ling a Seppelt, 1990). Každopádně není jasné, jak by mohla žít ve sněhu, když u ní nebylo nalezené žádné pohyblivé stádium (Remias et al., 2009).

Podmínky na Tiefenbachském ledovci jsou poměrně drsné. Během letního slunečného dne bylo naměřena intenzita záření přesahující  $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Tající materiál měl spíše kyselé pH a konduktivita byla obecně velmi nízká a pohybovala se v rozmezí od 2,5 do  $4,9 \mu\text{S cm}^{-1}$ , což indikuje extrémně nízké množství rozpuštěných iontů. Koncentrace fosfátu byla pod detekčním limitem. Na této lokalitě bylo také provedeno měření teploty a to od prosince do května, ve hloubce 40 cm pod sněhem. Tam se během zimních měsíců teplota pohybovala v rozpětí  $1^\circ\text{C}$  až  $-4^\circ\text{C}$ . V květnu sníh roztál (Remias et al., 2009).

*M. berggrenii* se nacházela hojně ve svazích s o  $20^\circ$ – $30^\circ$  vyšším sklonem než okolí, v otevřených a exponovaných oblastech. Pravděpodobně proto, že v těchto místech se později usazuje sníh. Odebraný vzorek obsahoval jednak anorganické tmavé částice z kryokonitu, červené cysty *Chlamydomonas* a zelené a nahnědlé buňky *M. berggrenii*, která se zde nacházela ve dvou varietách. Standardní variantě a pak variantně Alaskana, přičemž druhá a to menší (zhruba poloviční) varieta této řasy zde převažovala (Obr. 10). Buňky var. alaskana obsahují pouze jeden chloroplast, který se těsně před dělením zdvojnásobí, zatímco buňky standardní a větší variety obsahují chloroplasty dva, které se před buněčným dělením rozdělí





Obr. 10: Směs anorganického materiálu, zeleno-nahnědlá populace *Mesotaenium berggrenii* var. *alaskana* i standardní, spolu s červenou cystou *Chlamydomonas* (Remias et al., 2009)

na čtyři. Obě dvě variety *M. berggrenii* před buněčným dělením narostou alespoň o polovinu do délky, zatímco jejich průměr se zvětší jen nepatrně (Remias et al., 2009).

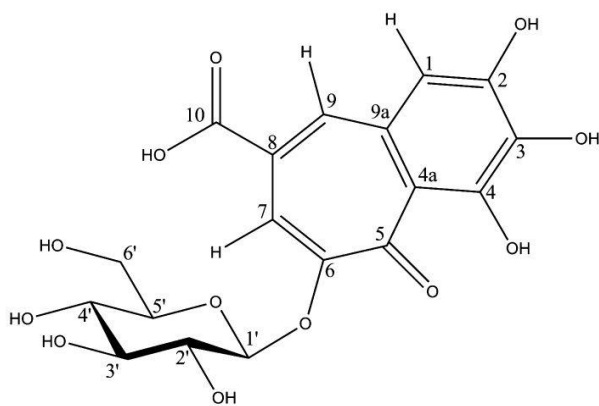
*M. berggrenii* má charakteristický vzhled. Ve světelném mikroskopu je dobře pozorovatelný jasně zelený chloroplast a tmavě fialové až hnědé vakuoly. Hnědá je i převážná část cytoplasmy, která je současně bohatá na ribosomy a dominují jí velké cisterny Golgiho aparátu. Výjimku tvoří centrální část s jádrem, která je bezbarvá. Bezbarvá jsou i hojně se vyskytující lipidová tělíska. Mezi jádrem a chloroplasty se vyskytují peroxisomy. Chloroplasty mají oválný diskovitý tvar, uprostřed jsou vyboulené a vždy obsahují zřetelný vícedílný prstencovitý pyrenoid, kolem

kterého je situované značné množství škrobu. Současně chloroplast obsahuje několik velmi dlouhých thylakoidních „pásů“ vedoucích skrze celou organelu. Thylakoidy jsou tvořeny malými grany se dvěma až šesti navrstvenými membránami. Buněčná stěna *M. berggrenii* je dvouvrstvá, horní vrstva je rosolovitá, jinak je buněčná stěna hladká a neobsahuje žádné výstupky ani póry. (Remias et al., 2009).

Hnědý pigment, uložený v periferních vakuolách, se pomocí spektrofotometrických testů podařilo určit jako fenolovou látku a to kondenzovaný tanin. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) odhalila ve vodném roztoku tři hlavní sloučeniny, jejichž světelná absorpce je závislá na pH. První sloučenina absorbovala pouze UV části spektra a nejlépe pojímala záření o vlnové délce 278 nm. Druhá a třetí sloučenina byl právě hnědý pigment s dost podobnou absorbcí s vrcholem absorbance na 304 nm a 389 nm. Současně druhé dvě sloučeniny absorbují i FAR. Třetí z těchto sloučenin se ukázala jako nový přírodní produkt, purpurogalinovou karboxylovou kyselinu-6-O- $\beta$ -D-glukopyranosidu, sumárním vzorcem  $C_{18}H_{18}O_{12}$  (Obr. 11) (Remias et al., 2012b).

Právě díky široké absorpční kapacitě v UV i FAR oblasti hraje tento pigment důležitou roli v adaptaci pro život na exponovaných místech a funguje tak obdobně jako ochranné pigmenty ostatních extrémofilů (Remias et al., 2012b). *M. berggrenii* totiž netvoří astaxantin





Obr. 11: Chemická struktura purpurogalinové karboxylové kyseliny-6-O- $\beta$ -D-glukopyranosidu (Remias et al., 2012b)

organelami. Konkrétně zvládne měnit pozici svých diskovitých chloroplastů a přeorientoávat je podle množství dopadajícího světla v průběhu několika hodin. Využívá k tomu fotosenzorické pigmenty lokalizované v cytoplazmě. Pohyb chloroplastu je založen na aktinomyosynovém systému (Wada et al., 1993).

Nově popsán pigment ( $C_{18}H_{18}O_1$ ) vznikl právě možná jako adaptace na zvyšující se množství dopadajícího UV v alpských lokalitách. Nicméně v buňkách *M. berggrenii* ze Svalbardu, kde byla hodnota UV záření nižší, bylo pigmentu stejně. Také je možné, že se jedná o chemickou obranu před herbivory (Remias et al., 2012b). Každopádně objev tohoto pigmentu je překvapující, protože podobné látky se vyskytují u vyšších rostlin, jako například u dubu mongolského, poddruhu *crispula* (Imai et al., 2009). Tato látka je zajímavá i třeba s ohledem na kosmetický průmysl. Jednak by mohla být využitelná jako UV ochrana lidské kůže, a dále pak také funguje jako antioxidant a antimikrobiální činidlo (Wagner et al., 2009, podle Remias et al., 2009).

*M. berggrenii* dokáže efektivně fotosyntetizovat i v teplotách blízcích se bodu mrazu při různých mírách ozáření, aniž by došlo k fotoinhibici. Kompenzační bod fotosyntézy byl ve vzorcích ze Svalbardu  $35,2 \mu\text{mol FAR m}^{-1} \text{s}^{-1}$ . V rámci experimentu bylo zjištěno, že při  $10^\circ\text{C}$  se zvedne výkon fotosyntézy i dýchání. Současně bylo zajímavé, že při kultivaci při  $5^\circ\text{C}$  a ozáření  $50 \mu\text{mol FAR m}^{-1} \text{s}^{-1}$  po dobu několika týdnů došlo nejenom k poklesu zbarvení vakuol, ale navíc se některé buňky rozdělily a začaly tvořit krátká vlákna (Remias et al., 2012b).

*M. berggrenii* má současně výkoný metabolismus. Ten je pro tento druh nezbytný, neboť buňky jsou po většinu roku trvale zmrazené a jsou aktivní jen na několik týdnů během

(Remias et al., 2009), který se hojně vyskytuje ve sněžných řasách, například *Chlamydomonas nivalis*, a chrání chloroplasty před nadměrným FAR a UV-A zářením (Gorton et al., 2001). *M. berggrenii* chrání jednostranně lokalizované chloroplasty pomocí vakuol s tímto hnědým pigmentem. Množství přijatého světla závisí na orientaci buňky (Remias et al., 2009). Buňka sama se sice nehýbe, ale *M. berggrenii* dokáže hýbat

pozdního léta, kdy odtaje sníh a ledovcový povrch zvlhne (Remias et al., 2012b). S tím souvisí i dobře vyvinuté mitochondrie, velký počet cis a trans golgiho váčků a ribosomů (Remias et al., 2009).

Tato psychrofilní řasa je schopná žít v drsných podmínkách i bez tvoření trvalých odolných stádií – cyst. I tím se liší od sněžných řas. Při zmrznutí zastaví svou aktivitu. Nicméně už týden po rozmrznutí při udržování teploty 5 °C začne znovu růst a dělit se. Zmrznutí i regeneraci vegetativních buněk zvládá *M. berggrenii* velmi dobře. Naopak má problémy s vyššími teplotami. Po třech dnech expozice v teplotě 20 °C bylo jen 60 % buněk úplně v pořádku, 29 % jich bylo mrtvých a 11 % téměř mrtvých (posuzováno podle zeleného fluorescenčního signálu). Navíc na mrtvých buňkách byly i morfologické změny jako například deformované chloroplasty (Remias et al., 2009).

*M. berggrenii* obsahuje relativně velké množství cukrů a polyolů. Sacharóza a glukóza tvořila 61 % řasových uhlohydrátů, 11 % glycerol, 26 % jsou neznámé cukry (Chapman et al., 1994) a obecně platí, že vysoká hladina cukrů a polyolů pomáhá tolerovat mráz, snižuje teplotu intracelulárního tuhnutí a zabraňuje poškození vysušením (Remias et al., 2009).

## 2.4 Sněžné řasy

### 2.4.1 Habitat

Sníh se tvoří v atmosféře, kdy nukleační jádra iniciují zmrznutí podchlazených kapiček vody. Děje se tak v mracích a výsledný tvar vloček závisí na teplotě, při které vznikaly. Nukleační jádra obsahují nejrozličnější anorganické látky jako například mořskou sůl či jíl nebo mikroby. Během sněžení pak sněhové vločky z atmosféry ještě vychytávají další částičky – od aerosolů až po spory a pyly nebo antropogenní znečištění. Současně během pádu mohou znovu rozmrznout a zmrznout a tím změnit svůj tvar. Sníh jako takový má spíše kyselé až neutrální pH pohybující se v hodnotách 3,9–6,7 a k neutralizaci dochází často vlivem organického prachu. Jinak se ve sněhu ještě hojně vyskytují ionty  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$ . Mezi charakteristické vlastnosti sněhu patří vysoké albedo a dobré izolační vlastnosti (Laybourn-Parry et al., 2012)..

Na sníh jsou vázány takzvané sněžné řasy, které žijí jednak přímo na sněhu, ale i uvnitř sněhové pokrývky, v závislosti na aktuální míře dopadajícího záření. Tvoří takzvané barevné sněhy, kdy sněhová pokrývka získá červenou, žlutou, šedou nebo třeba zelenou barvu vlivem

intenzivního růstu řas. Barevný sníh se vyskytuje na sněžných polích, která přetrvávají i přes léto, celosvětově v horských a také v polárních oblastech. Ve vyšších nadmořských výškách je míra slunečního záření výrazně vyšší než v nížinách a tak zde žijící organismy mohou být vystaveny až o 30 % vyššímu UV záření. To je patrnější hlavně u UV-B, které poškozuje nukleotidy, proteiny a inhibuje fotosyntézu, zatímco UV-A způsobuje nepřímé škody hlavně díky ROS, které napadají nukleotidy, bílkoviny a tuky. Fotooxidativnímu stresu navíc nahrávají teploty pohybující se kolem 0 °C (Morgan-Kiss et al., 2006).

Sněžné řasy se musí vyrovnat ale nejen s vyšší mírou záření a tudíž rizikem fotoinhibice a oxidativním stresem, ale i nízkými teplotami a současně také s nedostatkem živin, mrznutím a s tím spojeným vysycháním. Navíc sníh dobře absorbuje záření, a tak se mohou potýkat i s nedostatkem FAR záření. Proto je pro ně důležitá schopnost pohybu a přítomnost vegetativních bičíkatých stádií. Nicméně pro pohyb ve sněhu je důležitá přítomnost kapalné vody, a tak je pro ně vegetativní sezóna omezena na dobu jarního a letního tání. Po zbytek roku přečkávají v klidových odolných stádiích (Laybourn-Parry et al., 2012).

Společenstva žijící ve sněhu se souhrnně nazývají kryoseston. Pod toto označení spadají nejrozmanitější sinice (Cyanobacteria), obrněnky (Dinophyta), skrytěnky (Cryptophyta), zlativky (Chrysophyceae), rozsivky (Bacillariophyceae), různobrvky (Xanthophyceae) a zejména zelené řasy (Chlorophyta). Těmi se pak živí nálevníci (Ciliata), vířníci (Rotatoria), kroužkovci (Annelida) a chvostokoci (Collembola). Dále se ve sněhu vyskytují bakterie a houbové organismy jako třeba *Chionaster nivalis* a *Selenotila nivalis*. Počet druhů sněžných řas, které způsobují barevné sněhy, je však poměrně nízký a patří mezi ně převážně bičíkovci rodu *Chlamydomonas*, *Chloromonas*, *Chlainomonas* a nepohyblivé druhy z rodů *Raphidonema* a *Koliella* (Komárek a Nedbalová, 2007, Laybourn-Parry et al., 2012).

#### **2.4.2 *Chlamydomonas nivalis***

Jednou nejprostudovanějších sněžných řas je nejspíše *Chlamydomonas nivalis*, což je extremofilní druh žijící na sněhových polích charakterizovaných vysokou ozářeností (Gorton et al., 2001). Je to kosmopolitní, nejčastěji se vyskytující druh (Laybourn-Parry et al., 2012), žijící jak v alpských oblastech, tak v Arktidě a v Antarktidě. V alpských oblastech v Evropě se tento druh běžně vyskytuje ve velkých nadmořských výškách (> 1 800 m n. m., od května) (Remias et al., 2005). Byla nalezena i v Čechách v Krkonoších na Luční hoře (1450–1550 m n. m.) (Stibal, 2003). V polárních oblastech se nejvíce vyskytuje u pobřeží, poblíž ptačích kolonií (Remias et al., 2005).

Obývá horní vrstvu sněhu, kde žije v kapalně vodě mezi sněhovými krystaly. *Ch. nivalis* preferuje mokrá sněh s jemným, ale granulovaným sněhem na mírných a současně exponovaných svazích. Musí se zde vypořádat s velkou variabilitou intenzity záření, extrémním teplotním režimem i nedostatkem živin (Remias et al., 2005).

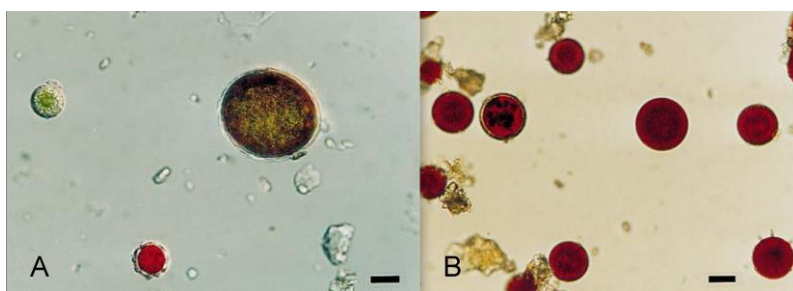
Druh *Ch. nivalis* je známý díky „červeným květům“ na tajícím sněhu (Obr. 13). Mimo červené může sníh barvit i na melounovou, růžovou či na karmínovou. Je to natolik výrazný jev, že si ho všimli už před více jak dvěma tisíci let, za dob Aristotela, byť tenkrát ještě nebylo známo, čím je sněhové zabarvení způsobeno (Gorton et al., 2001).

Za červené zbarvení mohou z velké části klidové kulovité buňky se silnou buněčnou stěnou a hladkým vnějším povrchem (Weiss, 1983), takzvané hypnoblasty. Jedná se o trvalé a odolné životní stádium. Hypnoblasty jsou sice nepohyblivé, ale jsou nesmírně odolné vůči vnějším změnám prostředí – denním cyklům i opakovanému zmrznutí a rozmrznutí (Remias et al., 2005). I když jsou tyto buňky považovány za klidová stadia, jsou fotosynteticky aktivní. V průměru jsou velké 10–50 µm (Gorton et al., 2001). Občas mají slizová pouzdra a k jejich povrchu mohou přilnout houbové nebo bakteriální organismy (Kol 1968, podle Muller et al., 1998). Stejně tak mají na povrchu často nalepené anorganické nečistoty, které obsahují křemík, železo a hliník, což může podporovat ochranu buňky (Remias et al., 2005). Hypnoblasty *Ch. nivalis* jsou schopné přežít i suchá a teplá období, stejně tak jako zvládnou vysoký tlak a teploty pod -35 °C (Kol 1968, podle Muller et al., 1998). Je to nezbytná schopnost, neboť mnoho jimi obývaných habitatů koncem léta roztaje a hypnoblasty jsou pak vystaveny po několik týdnů teplejším podmínkám. V rámci experimentu byl sebrán z exponovaných skal prach obsahující trvalá stadia a následně po dobu šesti měsíců uskladněn ve tmě v temperované místnosti. Když tento materiál po šesti měsících zalili vodou, ukázalo se, že hypnoblasty to přestály beze změny. Buňky tedy přežijí mezofilní teploty a období roztátého sněhu přecházejí v teplé půdě (Remias et al., 2005).



Obr 13 : Červené zbarvení sněhu  
(zdroj: [www.reallycoolpicsart.com](http://www.reallycoolpicsart.com))

Za nápadně červenou barvu hypnoblastů *Ch. nivalis* může sekundární karotenoid astaxantin. Akumulace tohoto pigmentu je spojena s přechodem ze zelených dvoubíčíkatých



*Obr. 14: Chlamydomonas nivalis A) rozdílné typy buněk fixované v roztoku glutaldehydu. Oválná velká buňka je pokryta několika silnými vrstvami buněčné stěny. Je nazelenalá a obsahuje červeno-hnědé struktury. Tmavočervená je hypnozygota. Méně pigmentovaná buňka je cysta, která bývá většinou spíše tmavočervená, ale roztok glutaldehydu odstranil pigment; centrální žlutozelený chloroplast je viditelný; B) trvalé stádium plné astaxantinu (Upraveno podle: Muller et al., 1998)*

chloroplast a jádro (Muller et al., 1998). Tyto kapičky v buňce, zabírají většinu jejího objemu, snižují tak v buňce obsah vody a brání vzniku poškození ledovými krystaly (Gorton et al., 2001). Astaxantin absorbuje světlo, které by jinak poškodilo fotosyntetický aparát, a chrání před nadměrným ozářením. Silně absorbuje zejména modré spektrum – vlnové délky 474 nm (Gorton et al., 2001). Navíc má astaxantin antioxidační účinky (Remias et al., 2005). *Ch. nivalis* proti účinkům nízkých teplot bojuje ještě vysokým podílem nenasycených mastných kyselin (až 75 %, Bidigare et al., 1993). Mimo to, že astaxantin je důležitý pigment pro *Ch. nivalis*, je zajímavý i z hlediska praktického využití. Využívá se v kosmetice i potravinářském průmyslu a to právě pro své silné antioxidační účinky a fakt, že je to dobré barvivo. Je využitelný i jako ochrana proti UV a současně má protizánětlivé účinky (Guerin et al., 2003).

Obsah astaxantinu v hypnoblastech je asi 20 krát vyšší než obsah chlorofylu *a*, byť vzorky sebrané začátkem sezóny obsahovaly astaxantinu o něco méně. Buňky pak byly méně červené a byl v nich lépe pozorovatelný chloroplast. Ten obsahuje grana s 3–7 thylakoidy a v mnoha buňkách se vyskytovalo i značné množství plastoglobulí (Remias et al., 2005).

HPLC ukázala přítomnost i dalších pigmentů. Jednak chlorofyl *a* i *b* a dále pak primární karotenoidy, které jsou běžné pro thylakoidy dalších zelených řas a vyšších rostlin. Dále byl nalezen ve stopovém množství echineonin. *Ch. nivalis* obsahovala i lutein a pigmenty spojené s xantofylovým cyklem, tedy violaxantin, anthraxantin a zeaxantin, kterých bylo třetinové množství co luteinu. Poměr chlorofilu a neoxantinu byl relativně konstantní. Stejně tak obsahovala vitamin E, tedy  $\alpha$ -tokoferol (Remias et al., 2005), což je důležitý antioxidant (Trebst, 2003). Akumulace karotenoidů je závislá na stáří buňky. Mladé buňky  $\alpha$ -tokoferolu

buněk na oranžové spory, hypnozygoty a tmavě červené cysty „barvící“ sníh – hypnoblasty (Obr. 14) (Müller et al., 1998). Stejně tak transformaci do hypnoblastu provází i masivní akumulace zásobních látek, jako jsou cukry a lipidy (Remias et al., 2005). Estery astaxantinu se kumulují v lipidových kapičkách a chrání centrální

obsahovaly při měření asi dvakrát víc než ty sebrané až později v průběhu sezóny. To by mohlo znamenat, že akumulace sekundárních karotenoidů snižuje světelný stres a tím i snižuje potřebu tohoto antioxidantu. Současně je pravděpodobné, že tvorba plastoglobulí v plastidech je i známkou vysokého obsahu tokoferolů. (Remias et al., 2005). *Ch. nivalis* obsahuje i fenoly, které mají též antioxidační účinky. Hladina prolinu je závislá na míře ozáření UV-A a UV-C (Duval et al., 1999).

Typická teplota pro fotosyntézu ve sněhové vrstvě je kolem 1,5 °C. V rámci experimentu bylo změřeno, že už v teplotě 4 °C se respirace zvýšila víc jak dvojnásobně a při 20 °C došlo ještě k dalšímu značnému nárůstu. Když byly buňky následně vystaveny slabému světlu tzn.  $< 100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , byl poměr fotosyntézy pozitivní jen při nízkých teplotách a od 16 °C už začínaly mít buňky *Ch. nivalis* problémy. S rostoucím zářením rostl i výkon fotosyntézy a to značně i při teplotách kolem 20 °C. Při velké intenzitě záření ( $1\,800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) byla fotosyntéza dokonce dva a půl krát účinnější při 20 °C než při 1,5 °C. Překvapivě u této kryofilní řasy nebyl zaznamenán pokles fotosyntézy při vyšších teplotách a stejně tak ani žádná fotoinhibice. *Ch. nivalis* tedy zřejmě není striktně kryofilní. Což je v rozporu s dřívějšími pozorováními. S ohledem na rostoucí respiraci s rostoucí teplotou jí však mezofilní podmínky nejspíše stresují (Remias et al., 2005).

V práci zabývající se aklimací na široké spektrum teplot ve vztahu k přenosu elektronů při fotosyntéze, lipidům a složení mastných kyselin dokonce došli k závěru, že *Ch. nivalis* bude dokonce možná kryotolerantní mezofil. Kmen *Ch. cf. nivalis* nechali růst při ozáření  $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  v teplotním rozpětí 5–35 °C, přičemž její růst se zastavil až při 30 °C. Při 5 °C rostla pomalu a od 10 °C už dosáhla maximální růstové rychlosti. Tyto výsledky srovnali s mezofilní řasou *Ch. reinhardtii*. Ta do 10 °C nerostla téměř vůbec a pak se rychlost růstu začala zvedat lineárně spolu s rostoucí teplotou. Maxima dosáhla při 30 °C, kdy rostla 1,6 krát rychleji než *Ch. nivalis*. Současně s tím zjistili, že *Ch. nivalis* má oproti *Ch. reinhardtii* vyšší produkci kyslíku. Při hledání molekulárních mechanismů souvisejících s adaptací fotosyntetického aparátu na nízké teploty objevily vysoké množství  $Q_A$  a  $Q_B$  přenašečů elektronů. Termodynamika procesu odhalila i rostoucí strukturální flexibilitu. Tu vysvětlují změnami aminokyselin v proteinu D1 v kombinaci s vlastnostmi thylakoidních membrán, které jsou z 80 % složeny ze záporně nabitých fosfatidylglycerolů. Navíc při studiu mastných kyselin se ukázalo, že *Ch. nivalis* dokáže do tří dnů pozměnit jejich složení, bez ohledu na své teplotní optimum (Lukeš et al., 2014).

Nicméně tak jako tak je to pravá sněžná řasa, výborně přizpůsobená svému habitatu (Remias et al., 2005).

### 2.4.3 *Chloromonas nivalis*

*Cr. nivalis* je další ze skupiny sněžných řas, žijící výhradně na letních sněhových polích a to jak v alpských, tak polárních oblastech (Remias et al., 2010). *Cr. nivalis* byla nalezena i v České republice u Plešného jezera, kde může sněhová pokrývka setrvat až do května, nebo například v Krkonoších v Labském dole a na Luční hoře (Stibal, 2003). Tato řasa obývá povětšinou horních 10 cm sněhu, kde se teplota v letních měsících pohybuje v rozmezí 0,8 až 0,1 °C. *Cr. nivalis* je na těchto lokalitách v letních měsících nápadná především díky barvení sněhu a to nejčastěji na zeleno, hnědo-oranžovo a občas i do růžova (Remias et al., 2010). Pohyblivá stadia jsou v terénu naležitelná jen vzácně (Remias et al., 2010). Mají asymetricky vřetenovitý tvar a žijí hlouběji ve sněhu (Ettl, 1983). Zato cysty *Cr. nivalis* se ve sněhu vyskytují hojně. Cysta *Cr. nivalis* je fotosynteticky aktivní, většinou se nedělí a energii získanou fotochemickou cestou, kterou skladuje zejména ve formě škrobových zrn, rozpustných cukrů, lipidů a sekundárních karotenoidů, využívá převážně ke svému růstu. Buňky významně rostou hlavně v prvních dvou týdnech tvorby cysty. Za tuto dobu se zvětší až o 30 % a o něco pomaleji roste i nadále (Remias et al., 2010). Cysta *Cr. nivalis* má vejčitý tvar s hladkou rozšiřitelnou primární buněčnou stěnou. Na sekundární buněčné stěně má vyvinuté žebra (Obr. 15) a často je k jejímu povrchu přilepen i nejrůznější anorganický detrit. Cysta obsahuje jádro, lipidová tělíska, mitochondrie, vakuoly a golgiho aparát s váčky bohatými na ribozomy, indikující aktivní metabolismus. Dále obsahuje i viditelné hrubé endoplazmatické retikulum, nepravidelný laločnatý pyrenoid a má charakteristikou plasmalemu, která má na vnitřních stranách řady mikrotubulů. S dozráváním cyst dochází ke změnám struktury plastidů. Chloroplast se zmenší a přesune do středu buňky. Ostatní plastidy se změni z kompaktních nepravidelných laloků na několik menších a diskovitě zaoblených. Tím se zvýší jejich efektivní plocha (Remias et al., 2010).

*Cr. nivalis* obsahuje astaxantin. Ve vzorcích z rakouských Alp se v průměru kolem 90 % veškerého astaxantinu vyskytovalo jako monoester (s nasycenými mastnými kyselinami), tudíž byl lipofilnější než volný astaxantin. Astaxantin u *Cr. nivalis* má alespoň dva typy vazby na mastné kyseliny, neb v různých retenčních časech byly nalezeny dva píky se stejným absorpčním spektrem. *Cr. nivalis* dále obsahuje chlorofyl *a* i *b* a  $\alpha$ -tokoferol (Remias et al., 2010). Velký obsah sekundárních pigmentů v cytoplazmě je obecně typický pro sněžné a ledovcové řasy, protože často slouží jako fotoprotektanty a pomáhají proti ROS



Obr. 15: *Chloromonas nivalis*, spóra s charakteristickými podélnými žebry. (zdroj: [www.ibot.cas.cz](http://www.ibot.cas.cz))

(Bidigare et al., 1993). Mimo to lipofilní pigmenty v kombinaci s lipidy snižují obsah vody v buňce a tím snižují i bod tuhnutí vnitrobuněčných prostorů pod bod mrazu. Navíc hromadění sekundárních karotenoidů může sloužit jako zásoba volného dusíku pro fotosyntézu v době nedostatku (Remias et al., 2010).

Díky astaxantinu v lipidových tělískách dostává *Cr. nivalis* během zrání typickou oranžovou barvu. Mladé cysty ho obsahují méně, jsou tedy zelenější (Remias et al., 2010). Stejně barvivo, ale ve vyšší koncentraci, obsahuje i *Ch. nivalis*, která je díky němu červená (Remias et al., 2005). Tyto dvě řasy se od sebe liší i formou obsaženého astaxantinu. *Cr. nivalis* obsahovala o 5% méně astaxantinu ve formě 13Z cis-izomeru než *Ch. nivalis*. Tento izomer má oblast absorpce spektra blízké 375 nm a může tak hrát důležitou roli v ochraně před stresem z nadměrného ozáření UV-A (Remias a Lütz, 2007). Vzhledem k tomu, že *Cr. nivalis* obsahuje jednak méně tohoto izomeru a i má celkově nižší obsah veškerého astaxantinu, tak by měl tento druh být méně odolný vůči nadměrnému záření (Remias et al., 2010).

To by odpovídalo i místům jejího výskytu. Zatímco *Ch. nivalis* žije i ve velkých nadmořských výškách, exponovaných stanovištích a vyskytuje se často spolu s ledovcovými řasami jako je například *M. berggrenii* (Remias et al., 2009), *Cr. nivalis* na ledových plotnách ani strmých svazích nenajdeme. *Cr. nivalis* žije v nižších horských oblastech s nadmořskou výškou 1900–2500 m n. m. a obecně se dokáže vypořádat s velkou i malou mírou ozáření. Intenzita FAR se na jedné alpské lokalitě v letních měsících pohybovala zhruba v rozmezí



1000-2000  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Od ostatních sněžných řas se *Cr. nivalis* liší i vyšším obsahem pigmentů v xantofylovém cyklu. Je možné, že právě pomocí xantofylového cyklu kompenzuje světelný stres, ke kterému je právě díky nižšímu obsahu astaxantinu náchylnější než *Ch. nivalis*. Množství violaxantinu, antheraxantinu a zeaxantinu (VAZ) se u *Cr. nivalis* během zrání cysty zvýšilo zhruba pětkrát. V poměru k chlorofylu *a* a *b* dosáhlo množství VAZ až hodnotu 0,154 (Remias et al., 2010), zatímco u druhu *Ch. nivalis* byla tato hodnota jen 0,03 (Remias et al., 2005).

*Cr. nivalis* stačí pro fotosyntézu i slabé osvětlení, čemuž nasvědčuje i nízká hodnota kompenzačního bodu ( $I_c$  14,9  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) (Remias et al., 2010). Dobře snáší nízké i silné ozáření, byť není až tak extrémofilní jako *Ch. nivalis* (Remias et al., 2005). Nicméně ani při velmi intenzivním záření u ní nebyla pozorována fotoinhibice (Remias et al., 2010).

### 3 Adaptační a aklimační strategie v trvale chladném prostředí

Psychrofilní fotoautotrofní organismy se ve svém prostředí potýkají s řadou problémů. Společným rysem jejich habitatů je nízká teplota, kterou většinou doprovázejí další extrémní podmínky. Musí tedy využívat řadu adaptačních a aklimačních strategií, které jim umožňují v daném prostředí uspět. Mezi nejznámější adaptace na chlad patří nejrozličnější modifikace membrán a enzymů díky, kterým buňky psychofilů zůstanou funkční. Současně jejich habitáty vykazují i další extrémy a bylo nutné se přizpůsobit i těm. Největší problém napříč různými typy habitatů představuje malá nebo naopak příliš vysoká intenzita FAR a UV záření.

#### 3.1 Membrány

Jedním z prvních problémů pro správné fungování buněk v trvale chladných habitatech je, že nízká teplota způsobuje tuhnutí lipidové dvojvrstvy a tím snižuje její propustnost. To má vliv na růst a fotosyntézu, a proto je snaha udržet membránu fluidní. Fluidita membrány je zásadní pro elektronový transport mezi fotosyntetickými komplexy. Ke zvýšení fluidity membrány psychofilní organismy využívají zvýšení podílu polynenasycených mastných kyselin, mastných kyselin s krátkými, větvenými nebo cyklickými řetězci (Morgan-Kiss et al., 2006). Zejména míra nenasycenosti mastných kyselin v lipidech hraje stěžejní roli. Schopnost

desaturovat mastné kyseliny má vliv i na schopnost odolávat fotoinhibici (Morgan-Kiss et al., 2006). Kromě teploty se míra nenasycenosti mastných kyselin obsažených v membránových lipidech odvíjí i od míry salinity (Nichols et al., 2000), vysychání, záření a dostupnosti živin (Morgan-Kiss et al., 2006).

Většina eukaryot a bakterií tvoří dvojné vazby nenasycených mastných kyselin až po vlastní syntéze pomocí dráhy aerobní desaturace membránových lipidů (Murata and Wada, 1995). Tuto reakci katalyzují enzymy ze skupiny desaturáz. Právě jejich zvýšenou expresí dochází k aklimaci na nízké teploty. Desaturázy spotřebovávají energii a tvoří dvojné vazby. Tento způsob tvorby nenasycených mastných kyselin je pro mikroorganismy výhodný i v teplotně nestabilních habitatech, neboť je nezávislý na růstu buňky (Morgan-Kiss et al., 2006).

Polynenasycené mastné kyseliny obsahují například psychrofilní mořské rozsivky jako je *F. cylindrus* (Fahl a Kattner, 1993), planktonní řasy – *Ch. raudensis* kmen UWO 241 (Possmayer et al., 2011), nebo sněžné řasy – například *Ch. nivalis* (Bidigare et al., 1993). Mezi typické nenasycené mastné kyseliny psychrofilních řas patří 16:1(n-7), 20:5 (n-3), 22:6 (n-3), 18:1(n-9) a 18:4 (n-3), přičemž první dvě nenasycené mastné kyseliny jsou typické zvláště pro rozsivky (Fahl a Kattner, 1993). Extrémně vysoký podíl polynenasycených mastných kyselin (přes 75 %) byl zjištěn v přírodním vzorku sněžné řasy *Chloromonas brevispina*. Vzorek obsahoval také neobvykle velké množství mastných kyselin s krátkými a středně dlouhými řetězci (Řezanka et al., 2008).

Kromě fluidity membrán, závisí fungování fotosyntézy za nízkých teplot na složení komplexu podjednotek proteinů asociovaných s membránou, které tvoří fotosyntetický elektronový transportní řetězec. Proteinové komponenty jsou ukotveny nejčastěji galaktolipidy, zejména monogalactosyldiacylglycerolem (MGDG) a digalactosyldiacylglycerolem (DGDG). Tyto látky jsou výlučně spojené s chloroplastem (Morgan-Kiss et al., 2006). Thylakoidní membrány sněžného kmene *Chlamydomonas* cf. *nivalis* obsahovaly velmi malé množství MGDG a DGDG a kolem 70 % membránových lipidů tvořil fosfatidylglycerol. Membrány s dominancí tohoto lipidu se vyznačují záporným nábojem, což může také přispívat ke zvýšení fluidity potřebné v podmínkách nízkých teplot (Lukeš et al., 2014).

### 3.2 Enzymy

Enzymy jsou podstatné pro fungování organismů, protože katalyzují metabolické reakce. Nicméně jejich aktivita spolu s teplotou klesá, a tak klesá i rychlost chemických reakcí. Už při poklesu teploty o 10 °C se sníží rychlost chemických reakcí dvakrát až třikrát. Aby organismy udržely i v nízkých teplotách vhodné reakční časy enzymaticky katalyzovaných reakcí, musí se s tímto problémem vypořádat.

Jednou z možností je zvýšení koncentrace enzymů, což ale nemusí být energeticky výhodné (Morgan-Kiss et al., 2006). Například Devos et al. (1998) pozorovali u dvou psychrofilních druhů z rodu *Chloromonas* (ANT1, ANT3) kultivovaných při teplotě 5 °C dvakrát vyšší koncentraci enzymu ribulóza-1,5-bisfosfát karboxylázy (RuBisCo) než u mezofilních druhů kultivovaných při teplotě 25 °C. Další možností jsou vlastní, na chlad adaptované enzymy, které vykazují vyšší katalytickou aktivitu i při nižších teplotách než jejich mezofilní protějšky, a současně s tím i nižší teplotní stabilitu (Gerday et al., 1997). Třetí možností je zvýšení hladiny ATP (Morgan-Kiss et al., 2006).

Několik dosud charakterizovaných psychrofilních enzymů vykazuje teplotní posun a maximální aktivity dosahují při nižších teplotách, než je běžné, za což může substituce aminokyselin, která zvyšuje flexibilitu těchto proteinů. Loppes et al. (1996) zkoumali teplotní závislost a teplotní stabilitu nitrát reduktázy a argininsukcinát lyázy z psychrofilní řasy *Chloromonas* sp. (ANT1). Oba dva psychrofilní enzymy vykazovaly posun maximální enzymatické aktivity do nižších teplot. Je poněkud zvláštní, že při porovnání enzymu RuBisCo psychrofilní řasy (*Ch. raudensis* UWO 241) a mezofilní *Chlamydomonas reinhardtii*, byl enzym psychrofila sice termosenzitivnější, nicméně karboxylová aktivita obou variant byla při vyšších teplotách (45–50 °C) srovnatelná a kolem 0 °C dokonce až dvakrát vyšší u „mezofilního“ RuBisCo (Devos et al., 1998).

Dalšími studovanými enzymy byly například DEAD-box RNA helikáza, která napomáhá rozvolnit RNA. Tomu za běžných podmínek napomáhá termální energie, s čímž je v chladných habitatech problém (Iost et al., 2013). DEAD-box RNA helikáza byla studována u *Chlamydomonas* sp. ICE-L a následně porovnána s *Ch. reinhardtii*, se kterou srovnali i míru exprese jednotlivých genů. Míra exprese některých genů (CiRH5, CiRH25, CiRH28 a CiRH55) byla u u psychrofila v chladných podmínkách signifikantně vyšší (Liu and Huang, 2015).

U *Chlamydomonas* sp. ICE-L byly studovány i antioxidační enzymy, neboť spousta chladných habitatů je zároveň i extrémně světelně exponovaných. S rostoucím mírou UV-B

záření roste i aktivita superoxid dismutázy, která chrání buňku před reaktivními formami kyslíku (Wang et al., 2009).

Obecně se toho o enzymech u psychrofilních řas ví málo, neboť nebyly studovány v takové míře, jako enzymy psychrofilních bakterií, a i tam je stále nad čím bádát. Obojí by zasloužilo další pozornost (Morgan-Kiss et al., 2006).

### **3.3 Led-vázající proteiny a kryoprotektanty**

Led-vázající proteiny, nebo též ice-binding proteiny (IBP) se vyskytují u nejrozličnějších na chlad adaptovaných organismů – od ryb, přes hmyz, rostliny, houby až po bakterie. IBP mají vícero různých rolí. Tyto extracelulární látky brání zmrznutí, tvoří nukleární jádra anebo inhibují rekrytalizaci ledu. IBP byly nalezeny i v několika izolátech polárních řas (Dolhi et al., 2013). U *F. cylindrus* byla dokonce objevená celá jedna nová třída IBP (Krell et al., 2008).

IBP má i kmen *Chlamydomonas raudensis* UWO 241, zatím co mezofilní kmen téhož druhu (SAG 49.72), žádnou podobnou aktivitu nevykazuje. Velké množství izoform IBP v *C. raudensis* UWO 241 je stejné jako například i v rozsivce *Fragilariopsis cylindrus*. Led-vázající proteiny mohou být pro psychofilní řasy důležité právě proto, že díky nim dokáží měnit strukturu ledu a zvednout tak šance na přežití buňkám v něm uvězněným. Zajímavé je, že kmen UWO 241 se ve svém prostředí s nedostává do přímého kontaktu s ledem, ale přesto produkuje IBP. Je ale pravděpodobné, že část buněk se díky ablaci ledové pokrývky může dostávat na povrch ledu a tvorba IBP může mít význam pro šíření druhu (Raymond and Morgan-Kiss, 2013).

IBP se zatím našly u všech prozkoumaných ledových a sněžných řas. U sněžné řasy *Chloromonas brevispina* byly nalezeny IBP dvojího typu, z čehož první typ byl nejspíše získán horizontálním genovým přenosem od hub či bakterií. Buňky tohoto druhu obsahují geny pro víc jak dvacet forem IBP, což svědčí o jejich důležitosti (Raymond, 2014)

Dalšími látkami významnými pro ochranu před zmrznutím jsou kryoprotektanty. Nejčastěji se jedná o sacharidy (glukóza, fruktóza) a alkoholy (manitol, glycerol). Stejnou funkci mohou mít i aminokyseliny (alanin, prolin, glycin). Svou přítomností zvyšují osmolaritu roztoku a zabraňují tvorbě ledu v buňce, nebo pokud se led vyskytuje extracelulárně, chrání buňku před dehydratací. Stabilizují proteiny, brání jejich agregaci vlivem nízké teploty a tím chrání buněčnou strukturu. Velké množství cukrů (nejvíce

sacharózy a glukózy) obsahuje například *M. berggrenii*, která mimo to obsahuje z dalších kryoptrotektantů i glycerol (Chapman et al., 1994). Pro změnu prolin zase obsahuje například *Ch. nivalis*, u které je jeho hladina závislá na míře ozáření UV (Duval et al., 1999). Tato látka byla zjištěna také u rozsivky *F. cylindrus* (Krell et al., 2008).

### 3.4 Fotosyntéza

Nedílnou součástí života všech řas je i sluneční záření. Některé se potýkají s jeho nedostatkem, jiné zase s nadbytkem.

Při nedostatku světla nastává problém s fotosyntézou. Řasy to mohou řešit buď snížením kompenzačního bodu, produkcí pigmentů které lépe absorbují aspoň tu část světelného spektra která je přítomná (jako například psychrofilní rozsivky obsahující pigment fukoxantin, který dobře absorbuje ty vlnové délky, které nejlépe prochází ledem (Thomas a Dieckmann, 2002)) a nebo přítomností světločivné skvrny a schopností pohybu (Laybourn-Parry et al, 2012).

Schopnost pohybu řeší i problém opačný – přílišnou ozářenost. Navíc buňky poškozuje i UV záření. UV-A v buňce vytváří ROS a nepřímo tak poškozuje nukleové kyseliny, bílkoviny a tuky, zatímco UV-B poškozuje nukleotidy a proteiny přímo a k tomu inhibuje fotosyntézu a růst (Morgan-Kiss et al., 2006). Navíc při velké intenzitě UV-B ( $70 \mu\text{W cm}^{-2}$ ) dochází k akumulaci superoxidů a malondialdehydů. Proto jsou pro organismy žijící na exponovaných místech nezbytné antioxidační enzymy, jako je například superoxid dismutáza nebo peroxidáza a kataláza (Wang et al., 2009).

I samotné nadbytečné záření může působit jako stresový faktor a způsobovat fotoinhibici. To se dá regulovat pomocí xantofylového cyklu, fotochemického a nefotochemického zhášení a pigmentů. Například při NPQ dochází k zhášení excitovaného chlorofylu a vibrace molekul odvedou přebytečnou energii ve formě tepla (Müller et al., 2001). Pomocí vibrací molekul odvádí přebytečnou energii i sekundární pigment astaxantin, hojně se vyskytující u sněžných řas. Je to karotenoid silně absorbující zejména modré záření (Gorton et al., 2001), který má navíc antioxidační účinky (Remias et al., 2005). Nejnověji objeveným fotoprotektivním pigmentem psychrofilních řas je fenolová látka – purpurogalinová karboxylová kyselina 6-O- $\beta$ -D-glukopyranosid, vyskytující se u *M. berggrenii*. Tato látka má silnou absorbní kapacitu UV i FAR záření a tak může *M. berggrenii* žít i na silně exponovaných stanovištích (Remias et al., 2012b).

### 3.5 Stručný souhrn

Psychrofilní řasy obývají nejrozličnější habitáty, které se od sebe v mnoha parametrech liší a to nejen dostupností světla a živin, ale i salinitou a dalšími faktory. Jejich hlavní typy jsou společně s jejich charakteristikou a adaptačními a aklimačními strategiemi uvedeny v Tabulce 1.

*Tabulka 1: Přehled hlavních typů chladných habitatů, jejich fotoautotrofních obyvatel a strategií, kterými čelí extrémním podmínkám.*

Společenstvo	Fyzikální extrémy	Fotosyntetičtí zástupci	Adaptační a aklimační strategie
Planktonní	Nízká teplota Salinita Nedostatek živin Nedostatek světla – modro-zelené spektrum Vertikální stratifikace	<i>Chlamydomonas</i> sp. Cryptophyceae Chrysophyceae	Aktivnější enzym RuBisCo Nízká hladina PSI Fototaxe Nenasycené mastné kyseliny IBP
Mořské ledové řasy	Nízká teplota Mění se salinita během oblevy Nedostatek světla a změny intenzity záření při odtávání	Penátní rozsivky <i>Chlamydomonas</i> sp. Chrysophyceae Chlorophyceae Cryptophyceae Dinophyceae Prymnesiophyceae Prasinophyceae	Fukoxantin Nenasycené mastné kyseliny NPQ SOD Nenasycené mastné kyseliny IBP Prolin
Ledovcové řasy	Nízká teplota Vysoká intenzita záření UV Nedostatek živin Krátká vegetační sezóna ROS	Rosivky <i>Chlamydomonas</i> sp. <i>Ancylonema</i> <i>Cylindrocystis</i> sp. <i>Mesotaenium</i> sp.	Pigmenty pohlcující UV Výkonný metabolismus Fenoly Posunutý kompenzační bod fotosyntézy Vysoký obsah cukrů
Sněžné řasy	Nízká teplota Nedostatek živin Vysoká intenzita záření a změny intenzity záření UV Krátká vegetační sezóna ROS	<i>Chlamydomonas</i> sp. <i>Chloromonas</i> sp. <i>Chlainomonas</i> sp. <i>Raphidonema</i> sp. <i>Kolliella</i> sp. Chrysophyceae	Odolná stádia Pohyblivá stádia Ochranné pigmenty – astaxantin, tokoferoly Fenoly Nenasycené mastné kyseliny IBP Prolin

## 4 Závěr

Psychrofilní řasy najdeme napříč různými taxonomickými skupinami. Nejvíce prostudovaní jsou zástupci rozsivek (Bacillariophyceae) a zelených řas z řádu Chlamydomonadales (*Chlamydomonas* spp., *Chloromonas* spp) a z třídy Conjugatophyceae (*Ancyronema*, *Mesotaenium*). Řasy, které obývají trvale chladné prostředí a jsou mu náležitě přizpůsobeny, najdeme i mezi zlativkami (Chrysophyceae) či skrytčkami (Cryptophyceae) a obrněnkami (Dinophyceae). Žijí volně ve vodním sloupci, porůstající ledové mořské kry a nebo slunci vystavené povrchy ledovců a sněhu. Aby přežily v extrémně chladném prostředí, řada druhů nezávisle na taxonomickém zařazení obsahuje polynenasycené mastné kyseliny, které zvyšují fluiditu membrán. Dále se u nich často nachází i „ice-binding“ proteiny bránící zmrznutí buňky, naopak psychrofilní enzymy umožňující některé metabolické procesy při nízkých teplotách byly dosud nalezeny pouze u malého množství druhů. Psychrofilní řasy současně využívají v závislosti na typu habitatu i nejrozumnější strategie, jak čelit nízké či naopak vysoké intenzitě slunečního záření.

Vybrat a definovat psychrofilní organismus, stejně jako striktně určit jeho habitat, není tak snadné, jak se zdá. Už jenom proto, že jde o poněkud umělé škatulkování. Navíc mnoho řas bylo označeno jako psychrofilní jen na základě jejich výskytu v chladném prostředí a nebyly podrobeny experimentům, které by potvrdily, že se nejedná jen o psychrotolerantní organismy.

Nicméně škatulkování jako takové není důležité. Mnohem podstatnější je, že jsou to většinou málo probádané organismy, žijící na podobně málo probádaných stanovištích. Tudiž v nich můžeme nalézt mnoho zajímavých látek. Ať už jde o známý a využívaný astaxantin a nebo purpurogalinovou karboxylovou kyselinu-6-O- $\beta$ -D-glukopyranosidu objevenou v *M. berggrenii*, využitelnou například v kosmetickém průmyslu (Remias et al., 2012b).

Navíc poznatky získané studium psychrofiních organismů jsou potenciálně využitelné i při studiu astrobiologie. Je možná sice zvláštní zmiňovat něco takového, když ještě ani žádný mimozemský život nebyl nalezen. Na druhou stranu, jestli tam někde v dáli něco doopravdy je, tak to na naše poměry bude žít nejspíš právě v extrémních podmínkách. A byť život objeven nebyl, zmrzlá voda už ano. Kapalná voda je právě nutnou podmínkou pro život a byla nalezena jak na Marsu, tak i na několika měsících Jupiteru. Předpokládá se, že na jednom z měsíců Jupiteru, na Europě, by mohla být pod tlustou vrstvou ledu i kapalná voda. Na Titanu, největším měsíci Saturnu, byla na povrchu kromě ledu nalezena, jako na jediném

dalším objektu v naší sluneční soustavě, i kapalina a to ve formě uhlovodíků (Laybourn-Parry et al., 2012).

Z „přízemnějších“ důvodů hlavně stojí za zmínku, že speciálně objevy spojené s enzymy psychrofilních organismů jsou potenciálně využitelné v biotechnologiích. Jejich aktivita při nízkých teplotách by mohla být ekonomicky výhodná, kdyby se je například povedlo zapojit při praní. Jednak by se ušetřilo za ohřev vody, jednak praní při nižších teplotách méně poškozuje tkaniny a barvu. Stejně tak jsou využitelné v potravinářském průmyslu. Bylo například patentováno odstraňování laktózy z mléka pomocí psychrofilní  $\beta$ -galaktosidázy. Také bylo navrženo použít psychrofilní organismy pro bioremediaci znečištěných půd, odpadních vod, využití v molekulární biologii a pekárenství. Zkrátka psychrofilní enzymy mají potenciál, ale zatím jsou jen málo prozkoumány (Feller a Gerday, 2003).

Tato práce není zdaleka vyčerpávající, nicméně i tak doufám, že poskytla alespoň základní náhled do života psychrofilních řas a shrnula dosavadní poznatky o jejich boji proti nástrahám jejich domovských habitatů a nastínila jejich potenciál.



## 5 Literárni zdroje

- Angino, E., Armitage, K., and Tash, J. (1964). Physicochemical limnology of Lake Bonney, Antarctica. *Limnol. Oceanogr.* 9, 207–217.
- Aslam, S.N., Cresswell-Maynard, T., Thomas, D.N., and Underwood, G.J.C. (2012). Production and characterization of the intra- and extracellular carbohydrates and polymeric substances (EPS) of three sea-ice diatom species, and evidence for a cryoprotective role for EPS. *J. Phycol.* 48, 1494–1509.
- Bidigare, R., Ondrusek, M., Kennicutt, M., Iturriaga, R., Harvey, H., Hoham, R., and Macko, S. (1993). Evidence for a photoprotective function for secondary carotenoids of snow algae. *J. Phycol.* 29, 427–434.
- Dawes, I.W. (2000). Response of eukaryotic cells to oxidative stress. *Agric Chem Biotechnol* 43, 211–217.
- Devos, N., Ingouff, M., Loppes, R., and Matagne, R.F. (1998). Rubisco adaptation to low temperatures: A comparative study in psychrophilic and mesophilic unicellular algae. *J. Phycol.* 34, 655–660.
- Dolhi, J.M., Maxwell, D.P., and Morgan-Kiss, R.M. (2013). Review: the Antarctic *Chlamydomonas raudensis*: an emerging model for cold adaptation of photosynthesis. *Extremophiles* 17, 711–722.
- Duval, B., Shetty, K., and Thomas, W.H. (1999). Phenolic compounds and antioxidant properties in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* after exposure to UV light. *J. Appl. Phycol.* 11, 559–566.
- Ettl, H. (1983). Chlorophyta I. Phytomonadina. In: Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H., Mollenhauer, D. (Eds.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, vol. 9. Gustav Fischer, Stuttgart, pp. 807.
- Fahl, K., and Kattner, G. (1993). Lipid-content and fatty-acid composition of algal communities in sea-ice and water from the Weddell Sea (Antarctica). *Polar Biol.* 13, 405–409.
- Falkowski, P., and Laroche, J. (1991). Acclimation to spectral irradiance in algae. *J. Phycol.* 27, 8–14.
- Feller, G., and Gerday, C. (2003). Psychrophilic enzymes: Hot topics in cold adaptation. *Nat. Rev. Microbiol.* 1, 200–208.
- Fritsen, C.H., and Prisco, J.C. (1999). Seasonal change in the optical properties of the permanent ice cover on Lake Bonney, Antarctica: Consequences for lake productivity and phytoplankton dynamics. *Limnol. Oceanogr.* 44, 447–454.
- Fuhrmann, M., Stahlberg, A., Govorunova, E., Rank, S., and Hegemann, P. (2001). The abundant retinal protein of the *Chlamydomonas* eye is not the photoreceptor for phototaxis and photophobic responses. *J. Cell Sci.* 114, 3857–63.
- Gerday, C., Aittaleb, M., Arpigny, J.L., Baise, E., Chessa, J.P., Garsoux, G., Petrescu, I., and Feller, G. (1997). Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge. *Biochim. Biophys. Acta-Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1342, 119–131.
- Gorton, H.L., Williams, W.E., and Vogelmann, T.C. (2001). The light environment and cellular optics of the snow alga *Chlamydomonas nivalis* (Bauer) Wille. *Photochem. Photobiol.* 73, 611–620.
- Guerin, M., Huntley, M.E., and Olaizola, M. (2003). *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol.* 21, 210–216.

- Hodson, A., Cameron, K., Boggild, C., Irvine-Fynn, T., Langford, H., Pearce, D., and Banwart, S. (2010). The structure, biological activity and biogeochemistry of cryoconite aggregates upon an Arctic valley glacier: Longyearbreen, Svalbard. *J. Glaciol.* 56, 349–362.
- Howard-Williams, C., Schwarz, A.-M., Hawes, I., and Priscu, J. (1998). Optical properties of the McMurdo Dry Valley lakes, Antarctica. In: Priscu, J.C. (Ed.) *Ecosystem dynamics in a polar desert*. Antarctic Research Series. Vol. 72. American Geophysical Union, Washington, DC, pp. 189–204.
- Chapman, B., Roser, D., and Seppelt, R. (1994). C-13 NMR analysis of antarctic cryptogam extracts. *Antarct. Sci.* 6, 295–305.
- Imai, K., Mitsunaga, T., Takemoto, H., Yamada, T., Ito, S., and Ohashi, H. (2009). Extractives of *Quercus crispula* sapwood infected by the pathogenic fungi *Raffaelea quercivora* I: comparison of sapwood extractives from noninfected and infected samples. *J. Wood Sci.* 55, 126–132.
- Iost, I., Bizebard, T., and Dreyfus, M. (2013). Functions of DEAD-box proteins in bacteria: Current knowledge and pending questions. *Biochim. Biophys. Acta-Gene Regul. Mech.* 1829, 866–877.
- Janknegt, P.J., van de Poll, W.H., Visser, R.J.W., Rijstenbil, J.W., and Buma, A.G.J. (2008). Oxidative stress responses in the marine antarctic diatom *Chaetoceros brevis* (Bacillariophyceae) during photoacclimation. *J. Phycol.* 44, 957–966.
- Kol, E. (1968). Kryobiologie. Biologie und Limnologie des Schnees und Eises. I. Kryovegetation. In: Elster, H.-J., Ohle, W. (Eds.) *Die Binnengewässer* vol 24. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, pp. 1–216. \*
- Kong, W., Li, W., Romancova, I., Prášil, O., and Morgan-Kiss, R.M. (2014). An integrated study of photochemical function and expression of a key photochemical gene (*psbA*) in photosynthetic communities of Lake Bonney (McMurdo Dry Valleys, Antarctica). *FEMS Microbiol. Ecol.* 89, 293–302.
- Komárek, J., and Nedbalová, L. (2007). Green cryoctic algae. In: Seckbach, J. (Ed.): *Algae and cyanobacteria in extreme environments*. Springer, AA Dordrecht, pp. 323–338.
- Krell, A., Beszteri, B., Dieckmann, G., Gloeckner, G., Valentin, K., and Mock, T. (2008). A new class of ice-binding proteins discovered in a salt-stress-induced cDNA library of the psychrophilic diatom *Fragilariopsis cylindrus* (Bacillariophyceae). *Eur. J. Phycol.* 43, 423–433.
- Laybourn-Parry, Tranter, M., and Hodson A.J., (2012). *The ecology of snow and ice environments*. Oxford university press, Oxford, pp. 179.
- Ling, H., and Seppelt, R. (1990). Snow algae of the Windmill islands, continental Antarctica - *Mesotaenium berggrenii* (Zygnematales, Chlorophyta) the alga of gray snow. *Antarct. Sci.* 2, 143–148.
- Liu, C., and Huang, X. (2015). Transcriptome-wide analysis of DEAD-box RNA helicase gene family in an Antarctic psychrophilic alga *Chlamydomonas* sp ICE-L. *Extremophiles* 19, 921–931.
- Liu, C.L., Huang, X.H., Wang, X.L., Zhang, X.C., and Li, G.Y. (2006). Phylogenetic studies on two strains of Antarctic ice algae based on morphological and molecular characteristics. *Phycologia* 45, 190–198.
- Lizotte, M., and Priscu, J. (1994). Natural fluorescence and quantum yields in vertically stationary phytoplankton from perennially ice-covered lakes. *Limnol. Oceanogr.* 39, 1399–1410.
- Loppes, R., Devos, N., Willem, S., Barthélemy, P., and Matagne, R.F. (1996). Effect of temperature on two enzymes from a psychrophilic *Chloromonas* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 32, 276–278.

- Lukeš, M., Procházková, L., Schmidt, V., Nedbalová, L., and Kaftan, D. (2014). Temperature dependence of photosynthesis and thylakoid lipid composition in the red snow alga *Chlamydomonas* cf. *nivalis* (Chlorophyceae). *FEMS Microbiol. Ecol.* 89, 303–315.
- Miao, J.L., Li, G.Y., and Hou X.G. (2002). Study on induced synthesis of anti-UV substances in the antarctic algae. *High Technology Letters* 6: 179–183 (v čínštině). \*
- Mock, T., and Gradinger, R. (1999). Determination of arctic ice algal production with a new in situ incubation technique. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 177, 15–26.
- Mock, T., and Valentin, K. (2004). Photosynthesis and cold acclimation: Molecular evidence from a polar diatom. *J. Phycol.* 40, 732–741.
- Mock, T., and Junge, K. (2007) Psychrophilic diatoms: mechanisms for survival in freeze-thaw cycles. In: Seckbach, J. (Ed.): *Algae and cyanobacteria in extreme environments*. Springer, New York, pp 345–364. \*
- Mock, T., Krell, A., Glockner, G., Kolukisaoglu, U., and Valentin, K. (2006). Analysis of expressed sequence tags (ests) from the polar diatom *Fragilariopsis cylindrus*. *J. Phycol.* 42, 78–85.
- Morgan, R.M., Ivanov, A.G., Prisco, J.C., Maxwell, D.P., and Huner, N.P.A. (1998). Structure and composition of the photochemical apparatus of the Antarctic green alga, *Chlamydomonas subcaudata*. *Photosynth. Res.* 56, 303–314.
- Morgan-Kiss, R., Ivanov, A.G., Williams, J., Khan, M., and Huner, N.P.A. (2002). Differential thermal effects on the energy distribution between photosystem II and photosystem I in thylakoid membranes of a psychrophilic and a mesophilic alga. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* 1561, 251–265.
- Morgan-Kiss, R.M., Ivanov, A.G., Pocock, T., Krol, M., Gudynaite-Savitch, L., and Huner, N.P.A. (2005). The Antarctic psychrophile, *Chlamydomonas raudensis* Ettl (UWO241) (Chlorophyceae, Chlorophyta), exhibits a limited capacity to photoacclimate to red light. *J. Phycol.* 41, 791–800.
- Morgan-Kiss, R.M., Prisco, J.C., Pocock, T., Gudynaite-Savitch, L., and Huner, N.P.A. (2006). Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 222–252.
- Morita, R. Y. (1975). Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 39, 144–167.
- Muller, P., Li, X.P., and Niyogi, K.K. (2001). Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.* 125, 1558–1566.
- Muller, T., Bleiss, W., Martin, C.D., Rogaschewski, S., and Fuhr, G. (1998). Snow algae from northwest Svalbard: Their identification, distribution, pigment and nutrient content. *Polar Biol.* 20, 14–32.
- Murata, N., and Wada, H. (1995). Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. *Biochem. J.* 308, 1–8.
- Neale, P., and Prisco, J. (1995). The photosynthetic apparatus of phytoplankton from a perennially ice-covered antarctic lake - Acclimation to an extreme shade environment. *Plant Cell Physiol.* 36, 253–263.
- Nichols, D.S., Olley, J., Garda, H., Brenner, R.R., and McMeekin, T.A. (2000). Effect of temperature and salinity stress on growth and lipid composition of *Shewanella gelidimarina*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2422–2429.

- Pandey, D.M., Kang, K.H., and Yeo, U.D. (2005). Effects of excessive photon on the photosynthetic pigments and violaxanthin de-epoxidase activity in the xanthophyll cycle of spinach leaf. *Plant Sci.* *168*, 161–166.
- Petrou, K., Doblin, M.A., and Ralph, P.J. (2011). Heterogeneity in the photoprotective capacity of three Antarctic diatoms during short-term changes in salinity and temperature. *Mar. Biol.* *158*, 1029–1041.
- Pocock, T., Lachance, M.A., Proschold, T., Priscu, J.C., Kim, S.S., and Huner, N.P.A. (2004). Identification of a psychrophilic green alga from Lake Bonney Antarctica: *Chlamydomonas raudensis* Ettl. (UWO 241) Chlorophyceae. *J. Phycol.* *40*, 1138–1148.
- Porazinska, D.L., Fountain, A.G., Nylen, T.H., Tranter, M., Virginia, R.A., and Wall, D.H. (2004). The biodiversity and biogeochemistry of cryoconite holes from McMurdo Dry Valley glaciers, Antarctica. *Arct. Antarct. Alp. Res.* *36*, 84–91.
- Possmayer, M., Berardi, G., Beall, B.F.N., Trick, C.G., Huener, N.P.A., and Maxwell, D.P. (2011). Plasticity of the psychrophilic green alga *Chlamydomonas raudensis* (UWO 241) (Chlorophyta) to supraoptimal temperature stress. *J. Phycol.* *47*, 1098–1109.
- Priscu, J.C., Wolf, C.F., Takacs, C.D., Fritsen, C.H., Laybourn-Parry, J., Roberts, E.C., Sattler, B., and Lyons, W.B. (1999). Carbon transformations in a perennially ice-covered Antarctic lake. *Bioscience* *49*, 997–1008.
- Ralph, P.J., Ryan, K.G., Martin, A., and Fenton, G. (2007). Melting out of sea ice causes greater photosynthetic stress in algae than freezing in. *J. Phycol.* *43*, 948–956.
- Raymond, J.A. (2014). The ice-binding proteins of a snow alga, *Chloromonas brevispina*: probable acquisition by horizontal gene transfer. *Extremophiles* *18*, 987–994.
- Raymond, J.A., and Morgan-Kiss, R. (2013). Separate origins of ice-binding proteins in Antarctic *Chlamydomonas* species. *Plos One* *8*, e59186.
- Remias, D., and Lütz, C. (2007). Characterisation of esterified secondary carotenoids and of their isomers in green algae: a HPLC approach. *Algol. Stud.* *124*, 85–94.
- Remias, D., Lutz-Meindl, U., and Lutz, C. (2005). Photosynthesis, pigments and ultrastructure of the alpine snow alga *Chlamydomonas nivalis*. *Eur. J. Phycol.* *40*, 259–268.
- Remias, D., Holzinger, A., and Luetz, C. (2009). Physiology, ultrastructure and habitat of the ice alga *Mesotaenium berggrenii* (Zygnemaphyceae, Chlorophyta) from glaciers in the European Alps. *Phycologia* *48*, 302–312.
- Remias, D., Karsten, U., Luetz, C., and Leya, T. (2010). Physiological and morphological processes in the Alpine snow alga *Chloromonas nivalis* (Chlorophyceae) during cyst formation. *Protoplasma* *243*, 73–86.
- Remias, D., Holzinger, A., Aigner, S., and Luetz, C. (2012a). Ecophysiology and ultrastructure of *Ancylonema nordenskioldii* (Zygnematales, Streptophyta), causing brown ice on glaciers in Svalbard (High Arctic). *Polar Biol.* *35*, 899–908.
- Remias, D., Schwaiger, S., Aigner, S., Leya, T., Stuppner, H., and Luetz, C. (2012b). Characterization of an UV- and VIS-absorbing, purpurogallin-derived secondary pigment new to algae and highly abundant in *Mesotaenium berggrenii* (Zygnematophyceae, Chlorophyta), an extremophyte living on glaciers. *FEMS Microbiol. Ecol.* *79*, 638–648.
- Řezanka, T., Nedbalová, L., and Sigler, K. (2008). Unusual medium-chain polyunsaturated fatty acids from the snow alga *Chloromonas brevispina*. *Microbiol. Res.* *163*, 373–379.

- Spiegel, R.H., and Prisco, J.C. 1998. Physical limnology of the McMurdo Dry Valley Lakes. In: Prisco, J.C. (Ed.) Ecosystem dynamics in a polar desert: The McMurdo Dry Valleys, Antarctica. Vol. 72. Antarctic Research Series, AGU Press, Washington, DC, pp. 153–88. \*
- Stibal, M. (2003). Ecological and physiological characteristics of snow algae from Czech and Slovak mountains. *Fotia* 3, 141–152.
- Tang, E.P.Y., Tremblay, R., and Vincent, W.F. (1997). Cyanobacterial dominance of polar freshwater ecosystems: Are high-latitude mat-formers adapted to low temperature? *J. Phycol.* 33, 171–181.
- Thomas, D.N., and Dieckmann, G.S. (2002). Ocean science – Antarctic Sea ice – a habitat for extremophiles. *Science* 295, 641–644.
- Trebst, A. (2003). Function of beta-carotene and tocopherol in photosystem II. *Z. Naturforschung Sect. C- J. Biosci.* 58, 609–620.
- Wada, M., Grolig, F., and Haupt, W. (1993). Light-oriented chloroplast positioning – contribution to progress in photobiology. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* 17, 3–25.
- Wagner, B., Oehrlein, R., Herzog, B., Eichin, K., Baisch, G., and Portmann, S. (2009). Preparation and use of benzotropolone derivatives as V absorbers and antioxidants and their use in sunscreens and/or cosmetic compositions. PCT Int Appl. CODEN: PIXXD2 WO 2009156324 A2 20091230. \*
- Wang, Q., Hou, Y., Miao, J., and Li, G. (2009). Effect of UV-B radiation on the growth and antioxidant enzymes of Antarctic sea ice microalgae *Chlamydomonas* sp ICE-L. *Acta Physiol. Plant.* 31, 1097–1102.
- Weiss, R. (1983). Fine-structure of the snow alga (*Chlamydomonas nivalis*) and associated Bacteria. *J. Phycol.* 19, 200–204.

\* sekundární citace

### Internetové zdroje:

- Antifrost-Eiweiße einer Eisalge sollen Tiefkühl-Brötchen vor Gefrierbrand schützen. *Alfred-Wegener-Institut Helmholtz-Zentrum für polar und meeresforschung* [online], [vid. 13. 5. 2016] Dostupné z: <http://www.awi.de/ueber-uns/service/presse/archiv/antifrost-eiweisse-einer-eisalge-sollen-tiefkuehl-broetchen-vor-gefrierbrand-schuetzen.html>
- Barevný sníh. *Botanický ústav AV ČR* [online], [vid. 22. 7. 2016] Dostupné z: [http://www.ibot.cas.cz/botanika/casopis\\_BOTANIKA\\_2014\\_1\\_Barevny-snih.html](http://www.ibot.cas.cz/botanika/casopis_BOTANIKA_2014_1_Barevny-snih.html)
- Cryoconite holes on glacier. *Snow addiction.org* [online], [vid. 13. 5. 2016] Dostupné z: <http://www.snowaddiction.org/2014/09/cryoconite-holes-on-glaciers.html>
- Detailed view for strain CCCryo 212-05. *Culture collection of cryophilic algae* [online], [vid. 13. 5. 2016] Dostupné z: <http://cccryo.fraunhofer.de/web/strains/detail-view/big/show/212-05>
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2016. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; vid. 28. 6. 2016
- *Chlamydomonas monadina*. *Portál Informačního systému ochrany přírody* [online], [vid. 13. 5. 2016] Dostupné z: [http://portal.nature.cz/publik\\_syst/nd\\_nalez-public.php?idTaxon=90395](http://portal.nature.cz/publik_syst/nd_nalez-public.php?idTaxon=90395)
- Research helps scientists understand climate change risk to Antarctic food webs. *Australian Antarctic Division: Leading Australia's Antarctic Program* [online], [vid. 13. 5. 2016] Dostupné z:

<http://www.antarctica.gov.au/news/2012/research-helps-scientists-understand-climate-change-risk-to-antarctic-food-webs>

- Temperature. *Academic.pgcc.edu* [online], [vid. 13. 5. 2016] Dostupné z: <http://academic.pgcc.edu/~kroberts/Lecture/Chapter%206/physical.html>
- Watermelon Snow in California. *Really cool pics* [online], [vid. 13. 5. 2016] Dostupné z: <http://www.reallycoolpicsart.com/2010/05/watermelon-snow-in-california.html>